



**BIOLOGIA REPRODUTIVA E CITOGENÉTICA
DA ALFAVACA DO CAMPO (*Ocimum
campechianum* Mill.)**

ANDERSON BRITO DA SILVA

2007

ANDERSON BRITO DA SILVA

**BIOLOGIA REPRODUTIVA E CITOGÊNÉTICA DA ALFAVACA DO
CAMPO (*Ocimum campechianum* Mill.)**

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

Orientador

Prof. *D.Sc.* Cláudio Lúcio Fernandes Amaral

Co-Orientadora

Profa. *D.Sc.* Eliane Mariza Dortas Maffei

VITÓRIA DA CONQUISTA
BAHIA-BRASIL
2007

Silva, Anderson Brito da
S578b

Biologia reprodutiva e citogenética da Alfavaca do Campo (*Ocimum campechianum* Mill.) / Anderson Brito da Silva. – Vitória da Conquista: UESB, 2007.
63 f.: il.; (Color.)

Orientador: Cláudio Lúcio Fernandes Amaral; Co-orientadora Eliane Mariza Dortas Maffei.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2007.
Referências: f. 54-64

1. *Ocimum campechianum* Mill. 2. Alfavaca do Campo – Citogenética. 3. Autogamia facultativa. 4. Fitotecnia – Tese. I. Amaral, Cláudio Lúcio Fernandes II. Maffei, Eliane Mariza Dortas. III. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Programa de Pós-Graduação em Agronomia. IV. T.

CDD: 633.8

Ficha catalográfica elaborada pela biblioteca da UESB

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

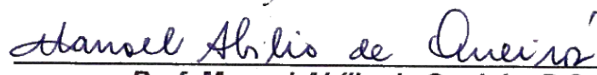
Título: “Biologia Reprodutiva e Citogenética da Alfavaca do Campo
(*Ocimum campechianum* Mill.)”.

Autor: Anderson Brito da Silva

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 da Silva, D.Sc. – UESB
Presidente



Prof. Manoel Abílio de Queiróz, D.Sc. – UNEB



Profª. Tiyoko Nair Hojo Rebouças, D.Sc. – UESB

Data de realização: 17 de janeiro de 2007.

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

Buy Now to Create PDF without Trial Watermark!!

A meu Deus e Pai do nosso Senhor e Salvador Jesus Cristo pelo constante amor e fidelidade: a honra e a glória pertencem a Ele.

A minha amada esposa Shirlei e ao nosso bebê Levi que, carinhosa e afetosamente, esperamos.

A meus pais Jorge e Valquíria, meus irmãos Alisson e Michele, e minha irmã em Cristo Jesus, a Marcela, pela dedicação, paciência, amor e carinho sempre dispensados a mim: meus amigos nos melhores e mais difíceis momentos da vida.

Created by eDocPrinter PDF Pro!!

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Cláudio Lúcio Fernandes Amaral pela confiança, incentivo e orientação no desenvolvimento deste trabalho.

À Profa. Dra. Eliane Mariza Dortas Maffei pelos preciosos conselhos, orientação, amizade e apoio no bom desenvolvimento desta dissertação.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia, pela confiança no meu trabalho e concessão da Bolsa de Estudos.

Ao Colegiado do Curso de Pós-graduação em Agronomia com Concentração em Fitotecnia, pela atenção e gentileza a mim dispensados.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Agronomia com Concentração em Fitotecnia, pela sólida formação proporcionada e, sobretudo pela gentileza e disponibilidade em ajudar.

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Oliveira pela orientação no estágio de ensino.

Aos colegas do Mestrado em Agronomia, pelo incentivo e entusiasmo contagiante nos momentos difíceis.

Aos professores e Direção do Colégio Polivalente Edivaldo Boaventura, pela compreensão e apoio durante o período em que estive cursando o Mestrado.

Buy Now to Create PDF without Trial Watermark!!

“E disse Deus: Produza a terra erva verde, erva que dê semente, árvore frutífera que dê fruto segundo a sua espécie, cuja semente esteja nela sobre a terra. E assim foi.”

Gênesis 1:11

Created by eDocPrinter PDF Pro!!

RESUMO

SILVA, A. B. **Citogenética e Biologia Reprodutiva da Alfavaca do Campo (*Ocimum campechianum* Mill.)**. Vitória da Conquista-BA: UESB, 2007. 63 p. (Dissertação – Mestrado em Agronomia, Área de Concentração em Fitotecnia).*

Ocimum campechianum Mill., conhecida no nordeste brasileiro como “alfavaca do campo”, é uma importante fonte de óleos essenciais, presentes em folhas, inflorescência e sementes, utilizados pela indústria farmacêutica, por conter eugenol, metil-eugenol, e linalol, também utilizados pela indústria de alimentos e perfumes. Os objetivos deste trabalho foram estudar a citogenética, particularmente o número de cromossomos, o comportamento meiótico e a viabilidade polínica, e a biologia reprodutiva do *O. campechianum* Mill. As análises citogenéticas usando o método de Feulgen e a Banda C confirmaram que todas as populações de *O. campechianum* estudados mostraram a presença de $2n = 48 + 2-4$ Bs cromossomos. A análise do comportamento dos cromossomos durante a meiose I foi realizada de maneira convencional ao microscópio óptico, confirmando a presença de 24 bivalentes na metáfase I. *O. campechianum* possui flores protândricas e hermafroditas, apresentando autogamia facultativa.

Palavras-chave: Óleos Essenciais. Cromossomos. Autogamia Facultativa.

* Orientador: Cláudio Lúcio Fernandes Amaral, *D.Sc.*, UESB e Co-orientadora: Eliane Mariza Dortas Maffei, *D.Sc.*, UESB.

ABSTRACT

SILVA, A. B. **Reproductive biology and cytogenetics of the Alfavaca do Campo (*Ocimum campechianum* Mill.)**. Vitória da Conquista-BA: UESB, 2007. 63 p. (Dissertation – Master's in Agronomy, Concentration Area in Crop Science).

Ocimum campechianum Mill., known in the Brazilian northeast as “alfavaca do campo”, is an important source of essential oils with is present in their leaves, flowers and seeds, used by the pharmaceutical industry, for containing eugenol, methyleugenol, and linalool also used for perfume and food industries. The objectives of this work were to study the cytogenetic particularly chromosome number, meiotic behavior and pollen viability, and reproductive biology of the *O. campechianum* Mill. The cytogenetic studies using Feulgen method and C Banding confirmed that all populations of *O. campechianum* studied showed the presence of $2n = 48 + 2-4 Bs$ chromosome number. Cytological analysis of meiotic behavior was employed to verify the meiotic behavior, confirming that chromosome of *O. campechianum* paired as 24 bivalents in metaphase I. *O. campechianum* has protandrous and hermaphroditic flowers and presents facultative autogamy.

Keywords: Essential Oils. Chromosomes. Facultative Autogamy.

* Adviser: Cláudio Lúcio Fernandes Amaral, *D.Sc.*, UESB and Co-adviser: Eliane Mariza Dortas Maffei, *D.Sc.*, UESB.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Aspecto da inflorescência de <i>O. campechianum</i> . Barra = 1 cm.	24
Figura 2.2 - Aspecto da flor de <i>O. campechianum</i> . Ca - Cálice, Co - corola, ant - antera, est - estigma. Barra = 1 mm.	25
Figura 2.3 - Senescência da flor de <i>O. campechianum</i> : antese, pós-antese e frutificação com persistência do cálice. Barra = 5 mm.	25
Figura 2.4 - Folhas de <i>O. campechianum</i> em diferentes estádios fenológicos. Barra = 3 cm.	26
Figura 3.1 - Cromossomos metafásicos de <i>O. campechianum</i> . Coloração de Feulgen. Barra = 5 μ m.	38
Figura 3.2 - Aspecto dos cromossomos na Meiose I. São indicados com setas cromossomo B. Barra = 5 μ m.	39
Figura 3.3 - Padrão da Banda Ag-NOR em <i>O. campechianum</i> Barra = 10 μ m.	44
Figura 3.4 - Aspecto do grão de pólen de <i>O. campechianum</i> : A - grão de pólen viável, B - Exina visível e núcleos vegetativo e germinativo. Coloração Giemsa. Barra = 50 μ m.	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Resultados dos experimentos de polinização realizados nas flores e da germinação em sementes de <i>O. campechianum</i>	28
Tabela 2.2 - Resumo da análise de variância da viabilidade do grão de pólen de <i>O. campechianum</i> avaliada com diferentes corantes.	29
Tabela 2.3 - Médias da viabilidade polínica com uso de diferentes corantes em função do comprimento do botão floral em <i>O. campechianum</i>	29
Tabela 3.1 - Comparativo dos complementos cromossômicos e cariótipos de espécies do gênero <i>Ocimum</i> L.	33
Tabela 3.2 - Valores médios do comprimento total dos cromossomos da alfavaca do campo (<i>Ocimum campechianum</i> Mill.)	40
Tabela 3.3 - Presença e número de cromossomos B em cinco populações de alfavaca do campo (<i>O. campechianum</i>).	42
Tabela 3.4 - Estádios do desenvolvimento do grão de pólen da alfavaca do campo associados aos valores médios do comprimento do botão floral.	45
Tabela 3.5 - Freqüência dos erros observados na meiose associados aos valores médios do comprimento do botão floral.	46
Tabela 4.1 - Médias da germinação de sementes de alfavaca de galinha (<i>Ocimum campechianum</i> Mill.) submetidas a escarificação química avaliadas 21 dias após a semeadura.	50

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

%G	Porcentagem de germinação
Bs	Cromossomos B
CMPs	Células Mãe do Grão de Pólen
DIC	Delineamento inteiramente casualizado
HUESB	Herbário da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia
IM	Índice de meiótico
mm	Milímetro
mM	Milimolar
N	Normal
NG	Início da germinação
NOR	Região organizadora do nucléolo
v/v	Razão volume por volume
VG	Velocidade de germinação
w/v	Razão peso por volume
µm	Micrômetro

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	14
1.1 Introdução e revisão da literatura.....	14
CAPÍTULO 2 - BIOLOGIA FLORAL E TENDÊNCIA REPRODUTIVA DA ALFAVACA DO CAMPO (<i>Ocimum campechianum</i> Mill.).....	17
2.1 Introdução.....	17
2.2 Material e métodos.....	18
2.2.1 Coleta, propagação e cultivo.....	18
2.2.2 Estudo da morfologia floral.....	19
2.2.3 Estudo dos eventos florais.....	19
2.2.4 Biologia da polinização.....	19
2.2.5 Receptividade dos estigmas.....	21
2.2.6 Disponibilidade e viabilidade dos grãos de pólen.....	21
2.2.7 Germinação de sementes.....	21
2.2.8 Parâmetros reprodutivos.....	22
2.2.8.1 Índice de auto-incompatibilidade.....	22
2.2.8.2 Eficácia reprodutiva.....	22
2.2.8.3 Relação pólen-óvulo.....	23
2.2.9 Presença de osmóforos e nectários.....	23
2.3 Resultados e discussão.....	24
2.3.1 Diagnose e fenologia floral.....	24
2.3.1.1 Biologia floral.....	24
2.3.1.2 Fenologia floral.....	27
2.3.2 Experimentos de polinização e parâmetros reprodutivos.....	27
2.3.3 Viabilidade polínica e receptividade do estigma.....	28
2.4 Conclusões.....	30
CAPÍTULO 331 - NÚMERO DE CROMOSSOMOS, COMPORTAMENTO MEIÓTICO E VIABILIDADE POLÍNICA EM ALFAVACA DO CAMPO (<i>Ocimum campechianum</i> Mill.).....	31
3.1 Introdução.....	31
3.2 Material e métodos.....	34
3.2.1 Coleta e obtenção do material vegetal.....	34
3.2.2 Estudo da mitose.....	34
3.2.3 Método de Feulgen.....	35
3.2.4 Bandeamento cromossômico.....	35
3.2.4.1 Banda C.....	35
3.2.4.2 Banda Ag-NOR.....	36
3.2.5 Comportamento meiótico e viabilidade dos grãos de pólen.....	36

3.2.6 Registro fotográfico, análise de imagens e estatística.....	37	
3.3 Resultados e discussão.....	37	
3.3.1 Estudo dos cromossomos mitóticos.....	37	
3.3.2 Cromossomos B.....	41	
3.3.3 Bandeamento cromossômico.....	42	
3.3.3.1 Banda C.....	42	
3.3.3.2 Banda Ag-NOR.....	43	
3.3.4 Comportamento meiótico e viabilidade polínica.....	44	
3.4 Conclusões.....	46	
CAPÍTULO 4 - ESTUDO DA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE		
ALFAVACA DO CAMPO (<i>Ocimum campechianum</i> Mill.).....		47
4.1 Introdução.....	47	
4.2 Material e métodos.....	48	
4.2.1 Coleta e local de realização do estudo.....	48	
4.2.2 Procedimento experimental.....	48	
4.2.3 Delineamento experimental e análise estatística.....	49	
4.3 Resultados e discussão.....	49	
4.4 Conclusões.....	51	
REFERÊNCIAS.....	52	

CAPÍTULO 1

CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1 Introdução e revisão da literatura

O gênero *Ocimum*, família *Lamiaceae*, compreende mais de 30 espécies de ervas e subarbustos encontradas em regiões tropical e subtropical da Ásia, África, América Central e do Sul, mas os principais centros de diversidade são os continentes africano e americano (SOBTI; PUSHANGADAN, 1982; PATTON, 1992; PATON; PUTIEVSKY, 1996; HARLEY, 1996; HARLEY, 2000; LORENZI; MATOS, 2002).

As plantas deste gênero apresentam grande diversidade de espécies, sendo conhecidas, popularmente, como alfavacas e manjericões (SIMON e outros, 1990; MORALES; SIMON, 1996; JAVANMARDI e outros, 2002).

No Brasil, podem ser anuais ou perenes a depender do local em que são cultivados e da aplicação comercial de seus subprodutos, com predomínio do uso das folhas frescas ou desidratadas na culinária, na produção de fitoterápicos, sendo as folhas, inflorescências e sementes, as principais partes utilizadas na obtenção de terpenóides e compostos fenólicos (SIMON e outros, 1990; JAVANMARDI e outros, 2002; BLANK e outros, 2004).

A principal matéria prima obtida das plantas do gênero *Ocimum* são os óleos essenciais, com elevado valor agregado nos mercados nacional e internacional, contidos nas folhas e ápices com inflorescências das espécies cultivadas como o manjericão doce (*Ocimum basilicum*), cuja obtenção se dá principalmente por processos de hidrodestilações, com destaque para o linalol (40,5 a 48,2%) (SIMON e outros, 1990; SIMON e outros, 1999; BLANK e outros, 2004).

Tomando-se como referência o preço do óleo essencial de manjeriço doce no mercado internacional, atingindo, no ano de 2004, valor próximo a US\$ 100,00/litro, pode-se ter uma noção do quanto a implantação do cultivo de espécies medicinais, aromáticas e condimentares pode ser uma atividade promissora e rentável aos produtores do Nordeste do Brasil (SIMON e outros, 1990; DARRAH, 1990; BLANK e outros, 2004).

Ocimum campechianum Mill, conhecida no nordeste brasileiro como Alfavaca do Campo ou Alfavaca de Galinha, é uma importante fonte de óleos essenciais, presentes em folhas, inflorescência e sementes, largamente utilizados pela indústria farmacêutica, por conter eugenol, metil-eugenol, elimicina e linalol (YUNES e outros, 2001; SILVA e outros, 2004), e de compostos fenólicos antioxidantes e aromáticos de interesse agrônômico e da indústria alimentícia (JAVANMARDI, e outros, 2003; SILVA e outros, 2004).

Os extratos da planta são usados na medicina tradicional no tratamento de reumatismo, paralisias, epilepsia e doenças mentais, além de conter compostos biologicamente ativos que são utilizados naturalmente como inseticida, nematicida, fungicida ou antimicrobiano (ALBUQUERQUE; ANDRADE, 1998; ECKELMANN, 2002; ALBUQUERQUE; ANDRADE, 2002; SILVA e outros, 2001; SILVA e outros, 2004).

As propriedades antidiarréicas e anti-colinérgicas dos chás preparados das folhas de *O. campechianum* são amplamente difundidas nas comunidades de baixa renda do semi-árido nordestino, tendo grande relevância social, uma vez que constituem uma alternativa aos medicamentos alopáticos no tratamento de diarreia e desidratação, especialmente em idosos e crianças recém-nascidas (HOAREAU; DASILVA, 1999; YUNES e outros, 2001; SILVA e outros, 2004).

O sistema de reprodução, juntamente com os mecanismos de dispersão de pólen e sementes desempenham papel central na determinação da estrutura

genética de populações (ALLARD, 1971; AHMAD; KHALIQ, 2002; BLANK e outros, 2004). Este conhecimento é de fundamental importância em programas de melhoramento e conservação genética porque permite delinear estratégias que otimizem a amostragem da variabilidade genética e a adoção de modelos genético-estatísticos adequados para a estimativa de parâmetros multifatoriais, como a síntese de terpenóides (ALLARD, 1971; KRISHNAN, 1981; ECKELMANN, 2002).

Para obter maior produção de óleos essenciais em Alfavaca do Campo via hibridação, seguida de seleção de germoplasma superior, é de fundamental importância conhecer seus aspectos reprodutivos e citogenéticos, tanto para subsidiar a condução de programas de melhoramento genético, quanto propor estratégias de conservação e ampliação da variabilidade genética desta importante espécie medicinal.

CAPÍTULO 2

BIOLOGIA FLORAL E TENDÊNCIA REPRODUTIVA DA ALFAVACA DO CAMPO (*Ocimum campechianum* Mill.)

2.1 Introdução

A maioria das variedades do gênero *Ocimum* disponíveis no mercado pertence à espécie *Ocimum basilicum* (SIMON e outros, 1999), havendo grande interesse por parte dos pesquisadores em encontrar materiais não domesticados que apresentem considerável produtividade em termos de óleos essenciais que possam ser hibridizados com *O. basilicum* produzindo descendentes férteis (SIMON e outros, 1984; HILTUNEN; HOLM, 1999; VIEIRA; SIMON, 2000).

Boa parte das espécies estudadas do gênero *Ocimum* L., além de serem autocompatíveis, são alocompatíveis, pois cruzamentos interespecíficos resultam em híbridos férteis, a exemplo de *O. kilimandscharicum* x *O. americanum* e *O. gratissimum* x *O. sanctum* (PUSHPANGADAN; SOBTI, 1982; KHOSLA, 1988).

Neste contexto, o conhecimento da biologia floral e dos mecanismos reprodutivos de espécies autóctones permitem, por exemplo, desenvolver estratégias para aumentar a eficiência de cruzamentos controlados com o intuito de se obter híbridos interespecíficos (RYDING, 1994; HILTUNEN; HOLM, 1999; ECKELMANN, 2002).

Ocimum campechianum Mill., uma das espécies menos conhecidas do gênero, nativa das Américas do Sul e Central, é popularmente conhecido como alfavaca de galinha, dentre outros nomes regionais, cujo potencial uso na farmacologia e indústria de alimentos vem sendo demonstrado recentemente (ALBUQUERQUE; ANDRADE, 1998b; SACCHETTI e outros, 2004; MANFREDINI e outros, 2004).

Embora sejam reconhecidas suas potencialidades e seu uso nas comunidades indígenas e tradicionais do norte e nordeste do Brasil, não foram encontrados na literatura científica disponíveis estudos sobre a biologia floral desta espécie medicinal, condimentar e aromática (FRANÇA e outros, 2004; HILTUNEN; HOLM, 1999; SACCHETTI e outros, 2004; SILVA e outros, 2004).

O objetivo desta seção foi estudar a biologia floral e a tendência reprodutiva da alfavaca do campo (*Ocimum campechianum* Mill.), visando subsidiar iniciativas futuras de hibridação e seleção em programas de melhoramento genético.

2.2 Material e métodos

2.2.1 Coleta, propagação e cultivo

Cinco acessos, representando cinco populações de *O. campechianum*, foram coletados nos municípios de Vitória da Conquista, Planalto, Jequié e Feira de Santana no Estado de Bahia e Fortaleza no Estado de Ceará, Brasil.

A triagem do material botânico foi realizada com uso de uma chave de classificação para espécies do gênero *Ocimum* que ocorrem no nordeste do Brasil proposta por Albuquerque e Andrade (1998a), sendo a identificação botânica realizada posteriormente por um especialista.

As sementes foram previamente selecionadas e, posteriormente, germinadas em bandejas de isopor de 128 células preenchidas com substrato composto por solo, esterco bovino e areia, numa proporção de 3:2:1.

As mudas obtidas foram transplantadas para canteiros de 5 m (comprimento) x 1 m (largura) x 0,25 m (altura) preenchidos pelo mesmo substrato solo, esterco bovino e areia, na proporção de 3:2:1, localizados na área

experimental da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Campus Universitário de Jequié, Bahia.

2.2.2 Estudo da morfologia floral

A descrição das flores e inflorescências de *Ocimum campechianum* Mill. foi baseada em estudos de material vivo (ALBUQUERQUE; ANDRADE, 1998a). As excicatas foram confeccionadas utilizando-se ramos com folhas e inflorescências contendo flores, frutos e sementes do material vivo. Após serem montadas, estas foram levadas para estufa onde, após 24 horas, foram devidamente identificadas para deposição no Herbário da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (HUESB) (MORI e outros, 1989).

2.2.3 Estudo dos eventos florais

O horário de antese das flores foi investigado pela marcação de 50 botões florais de 10 plantas tomadas ao acaso na véspera da abertura das flores. No dia seguinte, as flores foram observadas a cada 30 minutos entre 5h e 17h, anotando-se quando decorria os eventos florais pré-antese, antese e pós-antese. O horário de deiscência das anteras foi obtido de forma semelhante (PEREIRA; FREITAS, 2002).

2.2.4 Biologia da polinização

A taxa de autopolinização natural foi estimada pelo ensacamento de 250 botões florais de 25 inflorescências, tomadas aleatoriamente de cada um dos 20 (vinte) indivíduos. Os botões foram ensacados em sacos de polietileno providos

de poros, segundo a técnica de Ormond e Pinheiro (1974), 24 horas antes de sua abertura, ou antese, a qual deverá ser visualmente determinada (FAEGRI; PIJL, 1979; KEARNS; INOUE, 1993; CAMPOS e outros, 2004).

A autopolinização (autogamia) artificial foi realizada pelo ensacamento de 250 botões florais, que emasculados antes da deiscência das anteras, e posteriormente, polinizados manualmente com pólen de flores de outras inflorescências no mesmo indivíduo, sendo logo ensacados para não ocorrer contaminação (ORMOND; PINHEIRO, 1974).

A taxa de polinização cruzada (alogamia) natural foi estimada em 250 botões, os quais, após emasculados, ficaram expostos ao meio ambiente sem proteção alguma e, 24 horas após este processo, foram novamente ensacados, para evitar interferências externas, e, observados, diariamente, até a obtenção dos frutos (KEARNS; INOUE, 1993).

A taxa de polinização cruzada artificial foi obtida em 250 botões florais totalmente emasculados antes da deiscência das anteras. Tanto os botões artificialmente polinizados quanto aqueles dos quais o pólen foram retirados receberam a proteção com sacos de polietileno, a fim de evitar a contaminação com o pólen de outras flores (KEARNS; INOUE, 1993).

Imediatamente após a emasculação, as flores foram polinizadas e o pólen de uma planta foi conduzido até o estigma da flor de outra planta pertencente à outra população, com o uso de uma agulha de dissecação, flambada a cada vez que era usada; em seguida, os botões florais foram novamente ensacados. Também foram etiquetadas 50 flores aleatoriamente com o objetivo de estimar o percentual de frutos produzidos em condições naturais (KEARNS; INOUE, 1993).

2.2.5 Receptividade dos estigmas

Foi verificada pelo seu aspecto viscoso e umectante (ALMEIDA, 1986) e testada utilizando peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3% (KEARNS; INOUE, 1993), ressaltando-se que as flores foram observadas nos estádios de pré-antese, antese e pós-antese (AKORODA, 1983; SEDGLEY; SMITH, 1989; ALMEIDA e outros, 2004).

2.2.6 Disponibilidade e viabilidade dos grãos de pólen

A disponibilidade dos grãos de pólen foi estimada por meio da contagem de pólen das anteras nos diferentes estádios de desenvolvimento floral (VIEIRA e outros, 2004).

Foi analisada a viabilidade dos grãos de pólen com diferentes corantes, sendo eles: a orceína acética, o carmim acético, o corante segundo Giemsa e o reativo de Alexander, segundo as técnicas de Linsley e Cazier (1963), Lawrence (1966), Alexander (1980) e Almeida (1986), em diferentes estádios de desenvolvimento floral (ALEXANDER, 1980; MENDES, 1994; OLIVEIRA e outros, 2001; SOUZA e outros, 2002; EINHARDT e outros, 2006).

2.2.7 Germinação de sementes

As sementes foram lavadas com água destilada e colocadas para germinar em placas de Petri descartáveis de 90 mm de diâmetro forradas com papel filtro qualitativo umedecido com água deionizada. O experimento foi conduzido em câmara BOD Marconi MA-402 sob temperatura $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotoperíodo 14 horas de luminosidade, monitorado diariamente. O substrato foi

umedecido durante o período de duração do teste com água deionizada (FERREIRA; BORGHETTI, 2004).

A parcela experimental constituiu-se na placa contendo as sementes oriundas dos experimentos de polinização, perfazendo seis tratamentos com oito repetições em delineamento inteiramente casualizado (DIC). Foi avaliado o parâmetro percentagem de germinação (%G) (BRASIL, 1992; FERREIRA; BORGHETTI, 2004; SANTANA; RAMAL, 2004).

2.2.8 Parâmetros reprodutivos

2.2.8.1 Índice de auto-incompatibilidade

O índice de auto-incompatibilidade foi calculado com base no quociente do percentual de frutificações provenientes de autopolinizações pelo percentual de frutificações oriundas de polinizações cruzadas (BULLOCK, 1985; FREITAS; OLIVEIRA, 2002).

2.2.8.2 Eficácia reprodutiva

Foi estimada a eficácia reprodutiva pela razão entre o percentual de frutos formados por polinização aberta (controle) e dos frutos formados por polinização cruzada manual (ZAPATA; ARROYO, 1978; NATION e outros, 1992; FREITAS; OLIVEIRA, 2002).

2.2.8.3 Relação pólen-óvulo

A relação pólen-óvulo foi utilizada para estimar a tendência reprodutiva do *O. campechianum*, sendo calculada a partir da estimativa do número médio de grãos de pólen por flor em relação ao número de óvulos por flor, segundo parâmetro estabelecido por Cruden (1977), no qual estipulam-se cinco classes distintas, sendo elas: cleistogamia (2,7-5,4), autogamia obrigatória (18,1-39,0), autogamia facultativa (31,9-396,0), xenogamia facultativa (244,7-2588,0) e xenogamia obrigatória (2108,0-195525,0), cujos valores refletiram a eficiência da polinização. Segundo estimou Cruden, quanto mais eficiente a transferência de pólen, menor seria a razão pólen-óvulo (CRUDEN, 1977; CRUDEN, 2000; BENNETT, 2001).

2.2.9 Presença de osmóforos e nectários

A presença de osmóforos nas flores foi determinada por meio do teste com solução de vermelho neutro (diluição 1 g: 1000 ml) segundo metodologia de Kearns e Inouye (1993). Os locais de absorção e reflexão de raios ultravioleta foram identificados na corola segundo a metodologia descrita por Vogel (1993), e, os constituem atrativos aos visitantes florais, funcionando juntamente com os odores liberados pelos nectários como displays (KEARNS; INOUYE, 1993; SIQUEIRA FILHO; MACHADO, 2001; PIRES e outros, 2004).

2.3 Resultados e discussão

2.3.1 Diagnose e fenologia floral

2.3.1.1 Biologia floral

A planta é subarbustiva, perene, aromática, possui folhas simples verticiladas, opostas, elíticas. As inflorescências são terminais, plurifloras simples do tipo indefinida, racimosa, e a pré-floração é do tipo valvar induplicada (Figuras 2.1 e 2.4).

Na inflorescência em cada grupo de três flores há uma pequena folha. As flores têm coloração branca, sendo caracterizadas como completas, hermafroditas, cíclicas, hipóginas, diclamídeas e heteroclamídeas (Figuras 2.1).



Figura 2.1 - Aspecto da inflorescência de *O. campechianum*. Barra = 1 cm.
Fonte: Silva (2007).

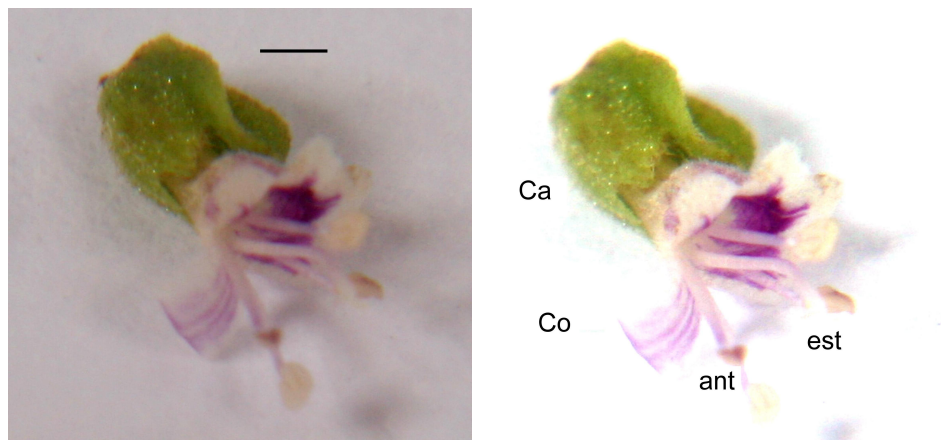


Figura 2.2 - Aspecto da flor de *O. campechianum*. Ca - Cálice, Co - corola, ant - antera, est - estigma. Barra = 1 mm.

Fonte: Silva (2007).



Figura 2.3 - Senescência da flor de *O. campechianum*: antese, pós-antese e frutificação com persistência do cálice. Barra = 5 mm.

Fonte: Silva (2007).

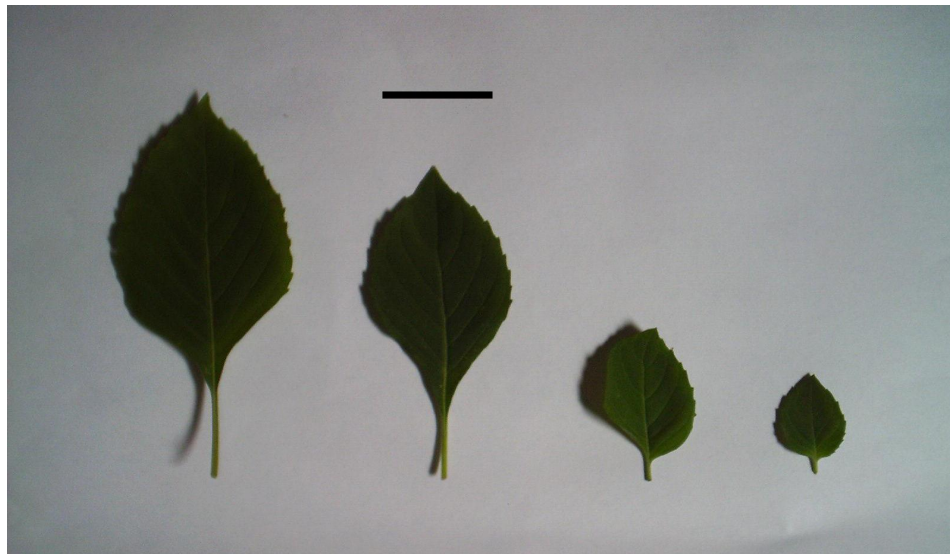


Figura 2.4 - Folhas de *O. campechianum* em diferentes estádios fenológicos. Barra = 3 cm.

Fonte: Silva (2007).

O cálice é persistente, gamossépalo, pentâmero e zigomorfo com coloração verde, com o labelo do cálice oposto ao labelo da corola, sendo persistente (Figuras 2.2 e 2.3). O cálice possui uma pequena quantidade de pêlos em toda a sua extensão, com coloração hialina. A corola é gamopétala, pentâmera, zigomorfa e caduca de coloração branca matizada de lilás (Figura 2.2).

O androceu é dialistêmone, homodínamo e epipétalo; as anteras são livres, dorsifixas, deiscência longitudinal, sendo o filete simples. O gineceu é gamocarpelar e bicarpelar, com estigma bífido, de coloração branca e com estilete ginobásico (Figura 2.2). O ovário é súpero, tetralobado.

Os frutos são esquizocárpicos subdividindo-se em quatro mericarpos, tetraquênios apresentando quatro sementes pequenas, amarronzadas e ligeiramente alongadas.

As flores de *O. campechianum* apresentam atributos florais relacionados à síndrome floral da melitofilia, tais como corola pouco tubulosa, odor doce, pequena distância entre a câmara nectarífera e os órgãos sexuais, e emissão de raios UV e antese diurna (Figura 2.2) (FAEGRI; PJIL, 1979; KHOSLA, 1986; VOGEL, 1993; SILVEIRA, 2004; PIRES e outros, 2004).

2.3.1.2 Fenologia floral

A fenologia floral foi realizada com espécimes de *O. campechianum* cultivados em canteiros a pleno sol com acompanhamento diário do número de flores e inflorescências em seis repetições (plantas). O início da floração se deu em média $62,5 \pm 2$ dias após a semeadura. Quanto ao florescimento, foram obtidos os seguintes resultados: a) taxa (percentagem acumulativa de flores na antese) - 15,6 flores por inflorescência por dia; b) pico (maior número de flores por inflorescência alcançado em um dia) - 20 flores; c) duração média de 24 horas.

2.3.2 Experimentos de polinização e parâmetros reprodutivos

A partir dos experimentos de polinização foi possível determinar o índice de auto-incompatibilidade e a eficácia reprodutiva do *O. campechianum* Mill. como sendo, respectivamente, 63,64% e 83,51% (Tabela 2.1).

A relação pólen-óvulo para a alfavaca do campo apresenta relação 220:1, segundo os índices propostos por Cruden (1977) indicam que *O. campechianum* é autógama facultativa, ou seja, esta espécie pode reproduzir-se tanto por este mecanismo, quanto por fecundação cruzada. Isto condiz com os

resultados obtidos pelos testes de polinização controlada que demonstram um sistema reprodutivo misto para esta espécie.

Tabela 2.1 - Resultados dos experimentos de polinização realizados nas flores e da germinação em sementes de *O. campechianum*.

Experimentos de polinização	TF (%)	TA (%)	TS (%)
Controle	65,4150	38,25	63,75
Autopolinização natural	58,3333	39,21	60,79
Autopolinização artificial	61,4575	39,13	60,87
Polinização cruzada natural	91,6633	59,01	40,99
Polinização cruzada artificial	78,3320	47,27	52,73

TF = Taxa de Frutificação Percentual, TA = Taxa de Abortamento Percentual, TS = Taxa de Sucesso Reprodutivo Percentual.

Para Sobti e Pushpangadan (1982), a maioria das espécies do gênero *Ocimum* são autocompatíveis e compatíveis entre si, pois cruzamentos interespecíficos resultam em híbridos férteis, a exemplo de *O. kilimandscharicum* x *O. americanum*.

No entanto, Ryding (1994) demonstrou que o entendimento do cariótipo das espécies que se pretenda hibridar é outro fator preponderante na obtenção de híbridos viáveis.

2.3.3 Viabilidade polínica e receptividade do estigma

O sucesso dos cruzamentos em programas de melhoramento genético está correlacionado com a viabilidade polínica (FAEGRI; PJIL, 1979). Informações sobre a época para se realizar polinizações, em relação ao momento da emasculação e viabilidade dos grãos de pólen, aumentam a possibilidade de sucesso com as hibridações artificiais (DAFNI, 1992; KEARNS; INOUYE, 1993).

Neste sentido, a estimativa da viabilidade polínica pode ser determinada através de um grande número de técnicas, as quais podem ser mais adequadamente empregadas, dependendo da resposta fisiológica da espécie estudada (FAEGRI; PJIL, 1979; DAFNI, 1992; KEARNS; INOUE, 1993).

Os dados experimentais demonstram que a deiscência das anteras ocorre na pré-antese quando o botão floral mede aproximadamente 4 e 5 mm de comprimento com liberação de grãos de pólen bem formados com viabilidade média de 98,375%. Na antese a viabilidade média dos grãos de pólen é de 99,906%, a qual ocorre entre as 10h30min às 12h30min de maneira assíncrona (Tabelas 2.2 e 2.3).

Tabela 2.2 - Resumo da análise de variância da viabilidade do grão de pólen de *O. campechianum* avaliada com diferentes corantes.

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	03	8,2467	2,7489	2,2960 ^{ns}
Resíduo	16	19,156	1,1973	
C.V. (%)	1,18 %			

ns = Não significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 2.3 - Médias da viabilidade polínica com uso de diferentes corantes em função do comprimento do botão floral em *O. campechianum*.

CBF (mm)	Coloração				Média
	Carmim	Orceína	Giensa	Alexander	
0,20	97,750	99,333	96,333	97,125	97,069
0,30	98,500	99,000	97,125	97,750	98,094
0,40	99,625	99,000	97,125	97,750	98,375
0,50	99,833	100,00	98,750	99,833	99,604
0,55	100,00	100,00	99,625	99,999	99,906
Média	99,142	99,500	97,792	98,491	
	$\sigma = 0,9743$ $R^2 = 0,9379$	$\sigma = 0,5056$ $R^2 = 0,9079$	$\sigma = 1,3506$ $R^2 = 0,8888$	$\sigma = 1,3267$ $R^2 = 0,8677$	

CBF = Comprimento do botão floral.

O estigma apresenta receptividade na pré-antese e durante os estádios de desenvolvimento floral subseqüentes, sendo que a receptividade somente ocorre após a deiscência da antera, quando o botão floral mede entre 4 e 5 mm de comprimento, e também quando já há pólen viável disponível. Portanto, *O. campechianum* é uma espécie protândrica, semelhante à maioria das espécies do gênero *Ocimum* (SOBTI; PUSHANGADAN, 1982).

2.4 Conclusões

As flores de *O. campechianum* são perfeitas, protândricas, apresentam atributos florais relacionados à síndrome floral da melitofilia, com antese diurna que ocorre entre as 10h30min e 12h30min e relação pólen-óvulo 220:1, indicando que se trata de uma espécie autógama facultativa. Os experimentos de polinização demonstraram que a eficácia reprodutiva é de 83,51% e seu índice de auto-incompatibilidade 63,64%.

CAPÍTULO 3

NÚMERO DE CROMOSSOMOS, COMPORTAMENTO MEIÓTICO E VIABILIDADE POLÍNICA EM ALFAVACA DO CAMPO (*Ocimum campechianum* Mill.)

3.1 Introdução

O gênero *Ocimum* (Família *Lamiaceae*) é uma fonte importante de óleos essenciais, fármacos e substâncias aromáticas largamente utilizadas pelas indústrias farmacêutica, alimentícia e de cosmético (HILTUNEN; HOLM, 1999; HARLEY, 2000; ECKELMANN, 2002).

Os principais centros de diversidade deste gênero são a África, a América do Sul (principalmente o Brasil) e Ásia, sendo relatadas em torno de 30 espécies, das quais as mais representativas são o manjeriço doce (*O. basilicum* L.), a alfavaca cravo (*O. gratissimum* L.), o manjeriço branco (*O. americanum* L.), o manjeriço santo (*O. sanctum* L.), e suas respectivas variedades cultivadas (PATTON, 1992; RYDING, 1994; SIMON e outros 1999; BLANK e outros, 2004).

O *Ocimum campechianum* Mill. (sinônimo *O. micranthum* Willd.) é uma das espécies menos conhecidas do gênero, nativa das Américas do Sul e Central, sendo popularmente conhecido como “*albahaca del campo*” ou “alfavaca do campo”, e extensamente usada pelas populações indígenas amazônicas bem como pelas comunidades tradicionais do nordeste brasileiro para fins medicinais e culinários (ALBUQUERQUE; ANDRADE, 1998b; BENNETT; PRANCE, 2000; VIEIRA; SIMON, 2000; SACCHETTI e outros, 2004).

Pesquisas recentes na área de fitoquímica demonstraram que o *O. campechianum* é uma espécie rica em óleos essenciais, presentes em folhas, flores e sementes, podendo ser utilizada como uma alternativa promissora e bastante produtiva em termos de rendimento, na substituição de outras espécies produtoras de eugenol e metil-eugenol como o manjeriço doce (SIMON e outros, 1990; VIEIRA; SIMON, 2000; SILVA e outros, 2004; SACCHETTI e outros, 2004).

O uso medicinal do *O. campechianum* no Brasil é relatado desde a floresta amazônica até a caatinga nordestina, com indicações para o tratamento de diversas enfermidades como dor, febre, vômito, bronquite, dor de ouvido e doenças coronarianas, no tratamento de diabete, artrite e asma (ALBUQUERQUE; ANDRADE, 1998b; LORENZI; MATOS, 2002).

Há relatos do uso de chás das folhas frescas por indígenas da Amazônia como um profilático da malária, sendo suas raízes recomendadas para o tratamento das febres decorrentes desta doença (VIEIRA; SIMON, 2000; LORENZI; MATOS, 2002; ALBUQUERQUE; ANDRADE, 2002).

Estudos básicos sobre aspectos citogenéticos e evolutivos de algumas espécies do gênero *Ocimum* foram realizados por Sobti e Pushpangadan (1982), os quais propuseram uma classificação dos cromossomos com base no comprimento absoluto designados como Grupo A (comprimento de 3,0 μ m e maiores), Grupo B (tamanho médio entre 2,0 μ m e 2,5 μ m) e Grupo C (cromossomos de 1,5 μ m e menores) (RANGASWAMY-AYYANGAR; VEMBU, 1981; SOBTI; PUSHPANGADAN, 1982).

As investigações baseadas em cariótipos mostraram que o número básico de cromossomos poderia ser utilizado como um caráter evolutivo para agrupar as espécies do gênero em duas Seções, a saber: o Grupo do Sanctum com $x = 8$ e Grupo do Basilicum com $x = 12$, os quais constam de espécies

diplóides e poliplóides (PUSHPANGADAN e outros, 1975; SINGH; SHARMA, 1981; PUSHPANGADAN; SOBTI, 1982; KHOSLA, 1988).

Estudos posteriores a respeito da caracterização dos recursos genéticos deste gênero restringiram-se na maioria das vezes à determinação do complemento cromossômico, provavelmente devido ao tamanho muito pequeno dos cromossomos e ao fato de a contagem simples ter sido bastante útil na resolução de problemas taxonômicos relacionados à similaridade morfológica, diversidade de nomes regionais e sinonímia presentes no grupo (Tabela 3.1) (SINGH; SHARMA, 1981; PUSHPANGADAN; SOBTI, 1982; KUNDU, 1987; KHOSLA, 1988; RYDING, 1994).

Tabela 3.1 - Comparativo dos complementos cromossômicos e cariótipos de espécies do gênero *Ocimum* L.

Espécie Caracterizada	Número de cromossomos	Fórmula Cariotípica
Seção A - Grupo do Basilicum (x = 12)		
<i>O. canum</i> Sims.	2n = 24	12 B + 12 C
<i>O. canum</i> Sims.	2n = 26	18 B + 8 C
<i>O. basilicum</i> L. var. <i>mínima</i> Benth	2n = 48	10 A + 14 C
<i>O. basilicum</i> L. var. <i>glabratum</i> Benth	2n = 48	10 A + 32 B + 6 C
<i>O. basilicum</i> L. var. <i>thyrsiflora</i> Benth	2n = 49	12A + 28B + 8C
<i>O. basilicum</i> L. var. <i>purpurascence</i> Benth	2n = 48	18 A + 20 B + 10 C
<i>O. americanum</i> L. (quimiótipo 01)	2n = 72	18 A + 44 B + 10 C
<i>O. americanum</i> L. (quimiótipo 02)	2n = 72	32 A + 38 B + 2 C
<i>O. kilimandscharicum</i> L.	2n = 76	48 B + 26 C
Seção B - Grupo do Sanctum (x = 8)		
<i>O. sanctum</i> L. (Purple)	2n = 32	16 B + 16 C
<i>O. sanctum</i> L. (Green)	2n = 32	18 B + 14 C
<i>O. gratissimum</i> L. (Raça 1)	2n = 40	2 A + 18 B + 20 C
<i>O. gratissimum</i> L. (Raça 2)	2n = 40	26 B + 14 C

Fonte: Sobti e Pushpangadan (1982).

O objetivo desta seção foi estudar os cromossomos mitóticos, o comportamento meiótico e suas implicações na viabilidade polínica em *Ocimum campechianum* Mill.

3.2 Material e métodos

3.2.1 Coleta e obtenção do material vegetal

Cinco acessos, representando cinco populações de *O. campechianum*, foram coletados nos municípios de Vitória da Conquista, Planalto, Jequié e Feira de Santana no Estado de Bahia e Fortaleza no Estado de Ceará, Brasil. Os espécimes foram cultivados a pleno sol em canteiros de 5 m (comprimento) x 1 m (largura), sendo as exsiccatas do material testemunha depositadas no Herbário da UESB.

3.2.2 Estudo da mitose

Para análise dos cromossomos mitóticos, sementes foram germinadas em placas de Petri descartáveis de 90 mm de diâmetro forradas com papel filtro qualitativo umedecido com água deionizada. As raízes jovens de aproximadamente 1 a 2 centímetros de comprimento foram coletadas e pré-tratadas com 2 mM 8-hidroxiquinoleína (Sigma) a 8°C por 24h, fixadas em etanol absoluto: ácido acético (3:1, v/v) por 24h à temperatura ambiente e armazenadas a -20°C. As preparações citológicas foram convencionalmente confeccionadas pelo método do esmagamento de acordo com Guerra e Souza (2002). As raízes foram hidrolizadas em HCl 5N (Merck) por 20min e esmagadas em uma gota de ácido acético a 45%. As lamínulas foram removidas a frio,

coradas com Giemsa 2% e montadas com Bálsamo do Canadá sintético (Rhenohistol) (Merck).

3.2.3 Método de Feulgen

Pontas de raízes previamente fixadas foram hidrolisadas em HCl 1N (Merck) por 11 min a 60°C. Após serem lavadas brevemente com água destilada, o material biológico foi acondicionado em reativo de Schiff (SIGMA) por duas horas em ambiente escuro. Após uma cuidadosa lavagem com água por gotejamento, as raízes foram esmagadas em uma gota de 45% ácido acético (SHARMA; SHARMA, 1980). Preparações foram analisadas com um mínimo de dez metáfases de boa qualidade para cada indivíduo, e, pelo menos cinco indivíduos foram selecionados por acesso. As lamínulas foram removidas a frio e montadas com Bálsamo do Canadá sintético (Rhenohistol) (Merck).

3.2.4 Bandeamento cromossômico

3.2.4.1 Banda C

As lâminas de banda C foram preparadas segundo Guerra e Souza (2002) com algumas modificações. Lâminas preparadas pelo método do esmagamento e não coradas, envelhecidas pelo menos dois dias, foram tratados com hidróxido de bário a 5% a temperatura ambiente por 10min, desnaturadas em 2×SSC a 60°C por 60min, coradas com Giemsa 3%. As melhores lâminas foram montadas em Bálsamo do Canadá sintético (Merck) (AGUIAR-PERECIN, 1985; SUMNER, 1990b; CARVALHO, 2000; TUNA e outros, 2001; SEIJO; FERNÁNDEZ, 2003).

3.2.4.2 Banda Ag-NOR

Raízes jovens foram fixadas em etanol absoluto: ácido acético (3:1, v/v) por 24h a temperatura ambiente e armazenada a 8°C. As mesmas foram hidrolisadas em HCl 5N (Merck) por 10min, lavadas em água destilada, esmagadas em uma gota de 45% ácido acético. As lâminas forma preparadas com 2 gotas de solução de gelatina nas 2% (em 1,0 mL de ácido fórmico) e 4 gotas de solução de nitrato de prata a 50%, sendo cobertas com lamínulas. As lâminas foram então submetidas à câmara úmida sob temperatura de 70°C por aproximadamente 60 min. Após a lavagem com água destilada e remoção da lamínula, as lâminas de melhor qualidade e resolução foram montadas em Bálsamo do Canadá sintético (HOWELL; BLACK, 1980; MAFFEI, 1996; SUMNER, 1990a; SUMNER, 2003).

3.2.5 Comportamento meiótico e viabilidade dos grãos de pólen

Para o estudo de meiose, inflorescências foram fixas em álcool absoluto:ácido acético (3:1, v/v) e armazenadas a -8°C por 24 h. As lâminas foram preparadas mediante o esmagamento das anteras em corante orceína acética ou Giemsa (BAPTISTA-GIACOMELLI e outros, 2000; ADAMOWSKI e outros, 2005). A configuração dos cromossomos na metáfase I, a morfologia das Células Mãe do Grão de Pólen (CMPs) e a formação das tétrades constituíram parâmetros analisados (DAWE, 1998; BAPTISTA-GIACOMELLI e outros, 2000; ADAMOWSKI e outros, 2005; AULER e outros, 2006).

A viabilidade dos grãos de pólen foi determinada com uso de diferentes corantes para efeito de comparação, sendo eles, orceína acética, carmim acético, Giemsa e reativo de Alexander (ALEXANDER, 1969; ALEXANDER, 1980; ORTOLANI, 2003; CORRÊA e outros, 2005).

Para o cálculo do índice de meiótico ($\% \text{ IM} = [\text{número de tétrades normais} \times 100] \div \text{somatório dos produtos pós-meióticos}$), de acordo com Love (1951). O índice meiótico considerado neste estudo foi obtido a partir das médias de pelo menos cinco lâminas para cada um dos dez indivíduos amostrados nas populações estudadas (DAWE, 1998; SOUZA e outros, 2006).

3.2.6 Registro fotográfico, análise de imagens e estatística

As melhores lâminas foram fotografadas por captura digital com uso do sistema fotográfico JVC modelo CG-QX5 acoplado ao microscópio óptico Leica CME, sendo as imagens processadas digitalmente no software Image-Pro Plus versão 4.5.0.29 (Media Cybernetics), e as medidas cromossômicas processadas no software MicroMeasure for Windows, versão 3.3 (REEVES; TEAR, 2000; REEVES, 2001). Os dados foram processados com uso do software estatístico Bioestat, versão 4.0 (AYRES e outros, 2005).

3.3 Resultados e discussão

3.3.1 Estudo dos cromossomos mitóticos

Um ensaio prévio utilizando a coloração com Giemsa demonstrou que todas as populações de *O. campechianum* estudadas possuíam 48 cromossomos, mas não era possível obter boas metáfases completas por causa da grande quantidade de cromossomos pequenos e sobreposições.

O único relato disponível na literatura científica do número de cromossomo para esta espécie foi limitado à contagem por técnicas convencionais usando Giemsa, mostrando também a presença de 48

cromossomos (SOBTI; PUSHANGADAN, 1982), porém não foi encontrada na bibliografia científica disponível, tão pouco em bancos de dados específicos, a presença de cromossomos B nesta espécie (JONES; DÍEZ, 2006).

As análises citogenéticas usando o método de Feulgen e a Banda C confirmaram que todas as populações de *O. campechianum* estudados mostraram a presença de $2n = 48 + 2-4$ Bs cromossomos (Figura 3.1 e 3.2).



Figura 3.1 - Cromossomos metafásicos de *O. campechianum*. Coloração de Feulgen. Barra = 5 μ m.

Fonte: Silva (2007).

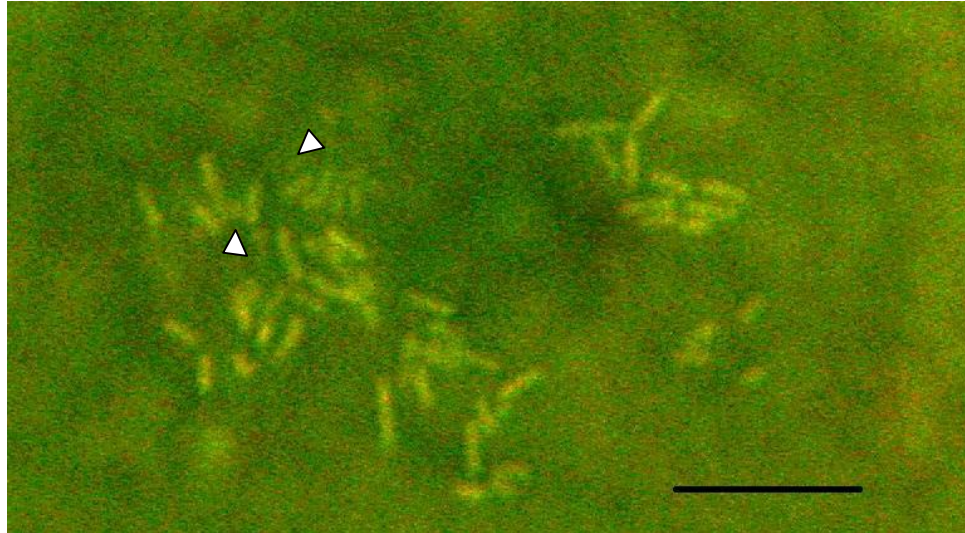


Figura 3.2 - Aspecto dos cromossomos na Meiose I. São indicados com setas cromossomo B. Barra = 5 μm .

Fonte: Silva (2007).

O comprimento absoluto dos cromossomos mitóticos na metáfase variou entre $1,141038 \pm 0,310064$ e $3,338471 \pm 0,251938$ μm . O comprimento total do genoma A foi de $99,23469 \pm 0,5772$ μm (Tabela 3.2). Com base na classificação morfológica proposta por Sobti e Pushpangadan (1982) foi possível propor uma fórmula cariotípica para *O. campechianum* como sendo $10A + 24B + 14C$ cromossomos (Tabela 3.2).

Tabela 3.2 - Valores médios do comprimento total dos cromossomos da alfavaca do campo (*Ocimum campechianum* Mill.).

Genoma A					
Cromossomo	LC (μm)	σ		LC (μm)	σ
01	3,338471	0,251938	25	1,957825	0,088876
02	3,176312	0,103932	26	1,935988	0,101148
03	3,100123	0,130376	27	1,912576	0,111514
04	3,052579	0,148256	28	1,855528	0,147548
05	3,022536	0,159887	29	1,841526	0,146382
06	2,959041	0,138805	30	1,831287	0,151891
07	2,899984	0,150829	31	1,791660	0,186117
08	2,765060	0,149352	32	1,782315	0,194193
09	2,711100	0,168395	33	1,769329	0,171736
10	2,628758	0,104963	34	1,740812	0,196379
11	2,484956	0,031148	35	1,662675	0,233032
12	2,451122	0,038112	36	1,630627	0,204329
13	2,436608	0,049861	37	1,625072	0,194719
14	2,304055	0,130564	38	1,625072	0,194719
15	2,293846	0,131183	39	1,613941	0,193447
16	2,207733	0,033460	40	1,575084	0,190173
17	2,182747	0,039556	41	1,541108	0,197002
18	2,161180	0,040002	42	1,479586	0,227321
19	2,161147	0,040029	43	1,444455	0,166530
20	2,059759	0,098787	44	1,384410	0,134128
21	2,022394	0,109320	45	1,282518	0,222239
22	2,002009	0,101875	46	1,257443	0,226409
23	1,983053	0,118173	47	1,187686	0,269013
24	1,960562	0,086532	48	1,141038	0,310064
				TLC	99,23469
				MLC	1,994610
				σ	0,577200
Genoma B					
Cromossomo	LC (μm)	σ			
I	0,761729	0,049432	TLC	2,873420	
II	0,741800	0,021248	MLC	0,718355	
III	0,705751	0,116739	σ	0,090864	
IV	0,664140	0,057892			

LC = comprimento do cromossomo, σ = desvio padrão, TLC = comprimento total dos cromossomos, MLC = média do tamanho dos cromossomos.

3.3.2 Cromossomos B

Os cromossomos B são cromossomos extranumerários relatados em mais de 1300 espécies de plantas e quase 500 espécies de animais (CAMACHO e outros, 2000; JONES; HOUBE, 2003). Os cromossomos B mostram polimorfismo numérico e, quando presentes em número elevado, podem afetar o crescimento, vigor e fertilidade de plantas negativamente, enquanto em pequeno número podem ser benéficos à planta ou servindo de marcador citogenético para citótipos de interesse (STEBBINS, 1950; JONES; HOUBE, 2003).

Estes cromossomos são menores que os cromossomos do genoma A e geralmente não são capazes de parear com nenhum deles. Quando em número elevado podem atrapalhar o pareamento dos cromossomos homólogos do genoma A no pólo equatorial da célula e em alguns casos provocar retardos na anáfase. Estudos revelaram que o retardo na anáfase provocado pelos Bs pode contribuir para a eliminação gradativa dos mesmos do genoma da planta (WARD, 1973; JONES; REES, 1982; JONES, 1991; LEVIN e outros, 2005).

Algumas famílias botânicas apresentam variações interespecíficas e mesmo interpopulacionais no que se refere à presença dos cromossomos B, enquanto em outras famílias há pouca ou nenhuma ocorrência (JONES; REES, 1995; MAFFEI, 1996; MAFFEI e outros, 1999; LEVIN e outros, 2005).

É possível que algumas das heterogeneidades que os autores encontram entre os taxa seja devido a diferenças em esforço de estudo. No entanto, é improvável que apenas os esforços de estudo possam explicar muitas das diferenças na frequência dos Bs que se encontram relatadas na literatura científica e nos bancos de dados específicos (JONES; HOUBE, 2003; LEVIN e outros, 2005).

Por exemplo, existem grupos relativamente bem estudados poucos registros de cromossomos de B como *Caryophyllaceae* e *Lamiaceae* (KANDEMIR, 2003; JONES; HOUBE, 2003; LEVIN e outros, 2005).

A ocorrência de cromossomos B em *O. campechianum* é informada aqui pela primeira vez, sendo observados nas cinco populações estudadas, apresentando assim variação interpopulacional de 2 a 4 Bs (Figura 3.2 e Tabela 3.3) (JONES; DÍEZ, 2004; JONES; DÍEZ, 2006).

Segundo Jones e Rees (1982), em algumas espécies cultivadas como o centeio a presença de Bs em número superior a 4 poderia levar à drástica diminuição do número de sementes produzidas, enquanto outras apresentariam uma tolerância maior à presença de cromossomos extranumerários em seu genoma, sem que se observem perdas no vigor ou sucesso reprodutivo da planta (STEBBINS, 1971; JONES; REES, 1982; JONES; REES, 1995; CAMACHO e outros, 2000; JONES; HOUBE, 2003).

Tabela 3.3 - Presença e número de cromossomos B em cinco populações de alfavaca do campo (*O. campechianum*).

Nº de Cromossomos	Cariótipo	Bs	Procedência
2n = 48	10A + 24B + 14C	02	Jequié
2n = 48	10A + 24B + 14C	02	Planalto
2n = 48	10A + 24B + 14C	02	Vitória da Conquista
2n = 48	10A + 24B + 14C	02	Feira de Santana
2n = 48	10A + 24B + 14C	04	Fortaleza

3.3.3 Bandeamento cromossômico

3.3.3.1 Banda C

A técnica de banda C revelou a presença de poucas regiões de heterocromatina em *O. campechianum*, com maior representatividade nos cromossomos maiores. Foi possível também confirmar a presença dos

cromossomos B, os quais apresentam-se completamente heterocromáticos, menores que os cromossomos do genoma A, com morfologia quase esférica, típica destes elementos extranumerários (Figura 3.2).

Mesmo tendo conseguido resultados satisfatórios, são sugeridos modificações no tempo da hidrólise ácida e ajustes no protocolo, uma vez que os cromossomos da alfavaca do campo são numerosos e muito pequenos.

3.3.3.2 Banda Ag-NOR

A coloração com nitrato de prata é o método citogenético mais comumente utilizado para revelar a posição da região organizadora do nucléolo (NOR) (HOWELL; BLACK, 1980; RUFAS e outros, 1982; SUMNER, 1990a).

Porém, o significado biológico desta técnica não é completamente entendido, tendo já sido causa de muitos debates durante vários anos. Recentemente, muitos trabalhos científicos têm demonstrado uma associação entre a Banda Ag-NOR e a atividade de transcrição de genes de ribossomais durante a interfase (HUBBEL, 1985; GUERRA, 1985; GUERRA, 1988; SUMNER, 1990a).

O bandeamento com nitrato de prata tornou possível localizar duas regiões ativas cujos padrões diferiram em intensidade e tamanho em todas as células interfásicas analisadas (Figura 3.3).

Alguns trabalhos científicos têm demonstrado que diferenças no padrão da banda Ag-NOR, associado a outras técnicas citogenéticas poderiam ser utilizadas para caracterizar recursos genéticos e entender melhor a evolução dos genomas de espécies cultivadas, especialmente em se tratando do estudo da poliploidia na evolução dos genomas das plantas (SUMNER, 1990; SUMNER, 1999; WENDEL, 2000; SCHIFINO-WITTMANN, 2004).

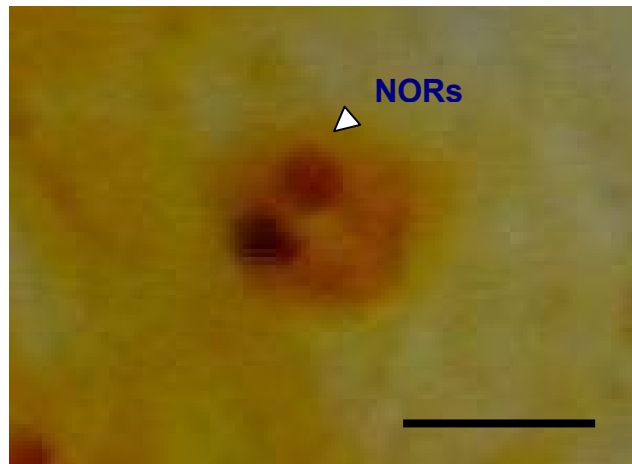


Figura 3.3 - Padrão da Banda Ag-NOR em *O. campechianum* Barra = 10 μm .

Fonte: Silva (2007).

3.3.4 Comportamento meiótico e viabilidade polínica

Devido ao pequeno tamanho dos cromossomos, os eventos da prófase I não puderam ser analisados claramente, sendo que nesse sentido uma análise citológica precisa se tornou impossível. A análise do comportamento dos cromossomos durante a meiose I foi realizada de maneira convencional ao microscópio óptico, confirmando a presença de 24 bivalentes e elementos extranumerários que não pareciam com nenhum dos homólogos (MICHELANGELI e outros, 2002; HAMANT e outros, 2006).

Foi possível estabelecer uma relação entre o tamanho do botão floral e os eventos da meiose, com seus desdobramentos na microsporogênese e formação dos grãos de pólen, como se observa na Tabela 3.4 (ver também Figuras 3.2 e 3.4). Algumas irregularidades na meiose foram observadas, sendo apresentadas quanto ao tipo e frequência na Tabela 3.5, não afetando

significativamente a produção de grãos de pólen, fato expresso no índice meiótico de 99,5996 % (RUVALCABA-RUIZ; RODRÍGUEZ-GARAY, 2002; HAMANT e outros, 2006, SOUZA e outros, 2006).

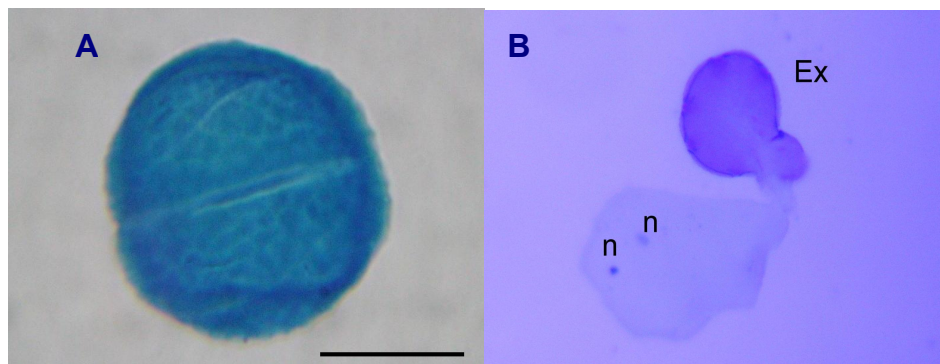


Figura 3.4 - Aspecto do grão de pólen de *O. campechianum*: A - grão de pólen viável, B - Exina visível e núcleos vegetativo e germinativo. Coloração Giemsa. Barra = 50 μ m.

Fonte: Silva (2007).

Tabela 3.4 - Estádios do desenvolvimento do grão de pólen da alfavaca do campo associados aos valores médios do comprimento do botão floral.

Tamanho do Botão Floral (mm)	Metáfase I	Anáfase I	Tétrades	Grãos de pólen viáveis
0,5 – 0,9 mm	+	-	-	-
1,0 – 1,9 mm	+	+	+	-
2,0 – 2,9 mm	-	-	+	+
3,0 – 3,9 mm	-	-	+	+
4,0 – 4,9 mm	-	-	-	+
5,0 – 5,4 mm	-	-	-	+
5,5 mm	-	-	-	+

Tabela 3.5 - Frequência dos erros observados na meiose associados aos valores médios do comprimento do botão floral.

Tamanho do Botão Floral (mm)	Retardo na Anáfase I	Tríades, díades	Micronúcleos Tétrades	Grãos de abortados
0,5 – 0,9 mm	0,015%	-	-	-
1,0 – 1,9 mm	0,020%	-	-	8,544 %
2,0 – 2,9 mm	-	0,010%	-	2,931 %
3,0 – 3,9 mm	-	-	0,010%	1,906 %
4,0 – 4,9 mm	-	-	-	1,625 %
5,0 – 5,4 mm	-	-	-	0,396 %
5,5 mm	-	-	-	0,094 %

3.4 Conclusões

As análises citogenéticas mostraram que todas as populações de *O. campechianum* estudadas mostraram a presença de $2n = 48$, com presença de cromossomos B com variação interpopulacional de 2 a 4 Bs. O bandeamento com nitrato de prata tornou possível localizar duas regiões organizadoras de nucléolo ativas cujos padrões diferiram em intensidade e tamanho em todas as células interfásicas analisadas. A análise do comportamento dos cromossomos durante a meiose I confirmou a presença de 24 bivalentes. O índice meiótico para a espécie foi de 99,5996 %. Foi possível propor uma fórmula cariotípica para *O. campechianum* como sendo $10A + 24B + 14C$ cromossomos.

CAPÍTULO 4

ESTUDO DA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE ALFAVACA DO CAMPO (*Ocimum campechianum* Mill.)

4.1 Introdução

Alfavacas e manjericões, pertencentes à família *Lamiaceae*, são plantas anuais ou perenes a depender do local em que são cultivadas e da aplicação comercial de seus subprodutos, com predomínio do uso das folhas frescas ou desidratadas na culinária, na produção de fitoterápicos, folhas frescas, inflorescências e sementes na obtenção de óleos essenciais, que constituem a matéria prima de maior valor agregado na indústria farmacêutica nacional e internacional (LORENZI; MATOS, 2002; AMARAL; SILVA, 2003; BLANCK e outros, 2004).

Ocimum campechianum Mill., conhecida no nordeste brasileiro como alfavaca de galinha, é uma importante fonte de óleos essenciais, presentes em folhas, inflorescência e sementes, largamente utilizados pela indústria farmacêutica, por conter eugenol, metil-eugenol, elimicina e linalol e de compostos fenólicos antioxidantes e aromáticos de interesse da indústria alimentícia (LORENZI; MATOS, 2002; AMARAL; SILVA, 2003; SILVA e outros, 2004).

Extratos da planta são usados na medicina tradicional no tratamento de reumatismo, paralisias, epilepsia e doenças mentais, além de conter compostos biologicamente ativos que são utilizados naturalmente como inseticida, nematicida, fungicida ou antimicrobial (ECKELMANN, 2002; SILVA e outros, 2004; EHLERT e outros, 2004).

Embora seja reconhecida a utilidade do *O. campechianum* na medicinal tradicional e na culinária regional, além de suas potencialidades (ECKELMANN, 2002; SACCHETTI e outros, 2004; SILVA e outros, 2004), não foram encontrados na literatura científica disponível estudos sobre a germinação de sementes desta espécie.

Sendo assim, esta seção trata do efeito da escarificação química sobre a germinação em sementes de alfavaca de galinha (*O. campechianum*), visando estabelecer estratégias de conservação e propagação desta importante espécie condimentar e medicinal do nordeste brasileiro.

4.2 Material e métodos

4.2.1 Coleta e local de realização do estudo

O material biológico foi obtido de coletas realizadas nos municípios de Vitória da Conquista, Planalto, Jequié e Feira de Santana no Estado de Bahia e Fortaleza no Estado de Ceará, Brasil. Após a triagem e seleção das sementes mais vigorosas, sendo tratadas com hipoclorito de sódio a 2%, durante 1 minuto e enxaguadas em água corrente por 5 minutos. O experimento foi realizado no Laboratório de Melhoramento e Produção Vegetal da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Campus de Vitória da Conquista.

4.2.2 Procedimento experimental

As sementes foram submetidas a seis tratamentos, constando do controle; três concentrações de ácido clorídrico, a saber, 0,5N, 1N e 2N; e duas concentrações de ácido acético glacial, 25% e 45%. As sementes foram então

submetidas aos respectivos tratamentos por um período de 3 minutos (BRASIL, 1992; FERREIRA; BORGHETTI, 2004).

Após os tratamentos, as mesmas foram lavadas com água destilada e colocadas para germinar em placas de Petri descartáveis de 90 mm de diâmetro forradas com papel filtro qualitativo umedecido com água deionizada. Cada placa recebeu 10 sementes, sendo o experimento conduzido em câmara BOD MARCONI MA-402 sob temperatura $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotoperíodo com 14 horas de luminosidade, sendo monitorado diariamente. O substrato foi umedecido durante o período de duração do teste com água deionizada (FERREIRA; BORGHETTI, 2004).

4.2.3 Delineamento experimental e análise estatística

A parcela experimental constituiu-se na placa contendo 10 sementes, perfazendo seis tratamentos com oito repetições em delineamento inteiramente casualizado (DIC). Foram avaliados os parâmetros percentagem de germinação (%G), velocidade de germinação (VG) e número médio de dias para o início da germinação (NG) (BRASIL, 1992; FERREIRA; BORGHETTI, 2004; SANTANA; RAMAL, 2004).

Os dados foram processados com uso do software estatístico Bioestat, versão 4.0 (AYRES e outros, 2005).

4.3 Resultados e discussão

O percentual de germinação do experimento foi de 16,04%. Os resultados do experimento referentes ao percentual de germinação revelam que apenas as sementes da Testemunha (63,75%) e do Tratamento 01 (32,5%)

germinaram (Tabela 4.1), enquanto as sementes dos demais tratamentos não germinaram mesmo 21 dias após a semeadura.

Tabela 4.1 - Médias da germinação de sementes de alfavaca de galinha (*Ocimum campechianum* Mill.) submetidas a escarificação química avaliadas 21 dias após a semeadura.

Tratamento	Média	Germinação (%)	NG	VG
Testemunha	6,375	63,75% a	4 ±1 dias	3,55 dias a
Tratamento 01	3,25	32,50% b	5 ±1 dias	3,77 dias b
Tratamento 02	0,0	0% c	-	-
Tratamento 03	0,0	0% c	-	-
Tratamento 04	0,0	0% c	-	-
Tratamento 05	0,0	0% c	-	-
Teste F	26,59*			

*Significativo pelo Teste F a 5% de probabilidade.

Porcentagem de germinação (%G), velocidade de germinação (VG) e número médio de dias para o início da germinação (NG). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste Tukey.

Pode-se perceber que as concentrações mais elevadas dos ácidos clorídrico e acético glacial influenciaram negativamente a germinação das sementes de *O. campechianum*, pois o Tratamento 01 mesmo em menor concentração (0,5 N) apresentou velocidade de germinação (VG) de 3,77 dias, um desempenho significativamente inferior ao apresentado pela Testemunha de 3,55 dias.

Segundo Brito e outros (2006) sementes de espécies do gênero *Ocimum* apresentam tegumento espesso com relativa dureza, sendo recomendados estudos de escarificação visando aumentar e uniformizar a germinação.

Entretanto, os resultados experimentais demonstram que apesar de duro, o tegumento mostrou-se pouco espesso, sendo que esse fato é expresso na diminuição considerável bem como na viabilidade das sementes por causa da morte dos embriões, comprovado pelo teste do Tetrázólio (FERREIRA; BORGHETTI, 2004).

Como o teste foi conduzido segundo a Regra Brasileira de Análise de Sementes, em condições controladas com sementes oriundas de polinização aberta, pode-se fazer uma comparação com o percentual de germinação para o manjerição (*Ocimum basilicum* L.) submetido às mesmas condições experimentais, apresentando resultados similares, contrastando com os dados de Brito e outros (2006) para *Ocimum canum* L. (BRASIL, 1992; SANTANA; RAMAL, 2004).

4.4 Conclusões

Pode-se concluir que a escarificação ácida possui efeito negativo sobre o percentual de germinação e velocidade de germinação em sementes de *Ocimum campechianum* Mill.

REFERÊNCIAS

- ADAMOWSKI, E. V.; PAGLIARINI, M. S.; BONATO, A. B. M.; BATISTA, L. A. R.; VALLS, J. F. M. Chromosome numbers and behavior of some *Paspalum* accessions. **Genetics and Molecular Biology**, v. 28, n. 4, p. 773-780, 2005.
- AGUIAR-PERECIN, M. L. R. Bandeamento-C e tipos de heterocromatina em milho. In: COLÓQUIO DE CITOGENÉTICA E EVOLUÇÃO DE PLANTAS, 1., 1985. **Anais...** Ribeirão Preto: SBG, 1985. p. 51-67.
- AHMAD, S. D.; KHALIQ, I. Morpho-molecular variability and heritability in *Ocimum sanctum* genotypes from northern himalayan regions of Pakistan. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 10, n. 5, p. 1084-1087, 2002.
- AKORODA, M. D. Floral biology in relation to hand pollination of white yam. **Euphytica**, v. 32, n. 3, p. 831-838, 1983.
- ALBUQUERQUE, U. P.; ANDRADE, L. H. C. El género *Ocimum* L. (Lamiaceae) en el nordeste del Brasil. **Anales Jardín Botánico de Madrid**, v. 56, n. 1, p. 43-64, 1998a.
- _____. Etnobotánica del género *Ocimum* L. (Lamiaceae) en las comunidades afrobrasileñas. **Anales Jardín Botánico de Madrid**, v. 56, n. 1, p. 107-118, 1998b.
- _____. Conhecimento botânico tradicional e conservação em uma área de caatinga no Estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil. **Acta bot. bras.**, v. 16, n. 3, p. 273-285, 2002.
- ALEXANDER, M. P. A versatile stain for pollen, fungi, yeast and bacteria. **Stain technology**, v. 55, n. 1, p. 13-18, 1980.
- _____. Differential staining of aborted and non aborted pollen. **Stain technology**, v. 44, p. 117-122, 1969.
- ALLARD, R. W. **Princípios do melhoramento genético de plantas**. São Paulo: Edgard Blucher, 1971. 381p.

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**, Maringá, v. 26, n. 3, p. 343-348, 2004.

AMARAL, C. L. F.; SILVA, A. B. Melhoramento biotecnológico de plantas medicinais: produção de alcalóides e óleos essenciais. **Biociência & Desenvolvimento**, Brasília, n. 30, p. 55-59, jan./jun. 2003.

ANDRADE, A. M.; GOMES, S. S. Influência de alguns fatores não genéticos sobre o teor de óleo essencial em folhas de *Eucalyptus citriodora* Hook. **Floresta e Ambiente**, v. 7, n. 1, p. 181 - 189, jan./dez. 2000.

AULER, N. M. F.; BATTISTIN, A.; REIS, M. S. Number of chromosomes, microsporogenesis and pollen viability in populations of carqueja [*Baccharis trimera* (Less.) DC.] from Rio Grande do Sul and Santa Catarina. **Brazilian Journal of Medicinal Plants**, v. 8, n. 2, p. 55-63, 2006.

AYRES, M.; AYRES JUNIOR, M.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. S. **Bioestat**. Versão 4.0. Aplicações estatísticas nas áreas de ciências biológicas e médicas. Belém: Sociedade Civil Mamuará, MCT/CNPQ, 2005.

BAPTISTA-GIACOMELLI F. R., PAGLIARINI M. S. AND ALMEIDA J. L. Meiotic behaviour in several Brazilian oat cultivars (*Avena sativa* L.). **Cytologia**, v. 65, p. 371-378, 2000.

BENNETT, B. C.; PRANCE, G. T. Introduced plants in the indigenous pharmacopoeia of Northern South America. **Economic Botany**, v. 54, p. 90-102, 2000.

BENNETT, S. J. Pollen-ovule ratios as a method of estimating breeding system in *Trifolium* pasture species. In: **Proceedings of the 10th Australian Agronomy Conference**, Hobart, 2001. Disponível em: <<http://www.regional.org.au/au/asa/2001/6/a/bennett.htm>>. Acesso em: 31 out. 2003.

BLANK, A. F.; CARVALHO FILHO, J. L. S.; SANTOS NETO, A. L.; ALVES, P. B.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; SILVA-MANN, R.; MENDONÇA, M. C. Caracterização morfológica e agrônômica de acessos de manjeriço e

alfavaca. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 1, p. 113-116, jan./mar. 2004.

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

BRITO, A. C.; PEREIRA, D. A.; AMARAL, C. L. F. Influência da temperatura na germinação de sementes de *Ocimum canum* Sims, **Caatinga**, v. 19, n. 4, p. 397-401, 2006.

BULLOCK, S. H. Breeding systems in the flora of tropical deciduous forest. **Biotropica**, v. 17, p. 287-301, 1985.

CAMACHO, J. P. M.; SHARBEL, T. F.; BEUKEBOOM, L. W. Bchromosome evolution. **Phil. Trans. R. Soc. Lond. B**, v. 355, p. 163-178, 2000.

CAMPOS, R. S.; LEMOS, E. E. P.; OLIVEIRA, J. F.; FONSECA, F. K. P.; SANTIAGO, A. D.; BARROS, P. G. Polinização natural, manual e autopolinização no pegamento de frutos de pinheira (*Annona squamosa* L.) em Alagoas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 26, n. 2, p. 261-263, ago. 2004.

CAMPOS, R. S.; LEMOS, E. E. P.; OLIVEIRA, J. F.; FONSECA, F. K. P.; SANTIAGO, A. D.; BARROS, P. G. Polinização natural, manual e autopolinização no pegamento de frutos de pinheira (*Annona squamosa* L.) em Alagoas. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal, v. 26, n. 2, p. 261-263, ago. 2004.

CARVALHO, J. F. R. P. **Análise cariotípica e indução *in vitro* de poliploidia em urucum (*Bixa orellana* L.)**. 2000. 124 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Curso de Pós-graduação em Genética e Melhoramento da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brasil.

CORRÊA, M. G. S.; VIÉGAS, J.; SILVA, J. B.; ÁVILA, P. F. V.; BUSATO, G. R.; LEMES, J. S. Meiose e viabilidade polínica na família Araceae. **Acta Bot. Bras.**, v. 19, n. 2, p. 295-303, 2005.

CRUDEN, R. W. Pollen-ovule ratios: a conservative indicator of breeding systems in flowering plants. **Evolution**, v. 31, p. 32-46, mar. 1977.

_____. Pollen grains: why so many? **Pl. Syst. Evol.**, v. 222, p. 143-165, 2000.

DAFNI, A. **Pollination ecology: a practical approach**. New York: Oxford University Press, 1992. 250p.

DARRAH, H. H. **The cultivated basils**. Independence: Thomas Buckeye Printing, 1980.

DAWE, R. K. Meiotic chromosome organization and segregation in plants. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v, 49, p. 371-395, 1998.

ECKELMANN, S. B. J. **Biodiversität der Gattung *Ocimum* L., insbesondere der Kultursippen**. 2002. 142 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Curso de Pós-graduação da Universität Kassel, Kassel, Alemanha.

EHLERT, P. A. D.; LUZ, J. M. Q.; INNECCO, R. Propagação vegetativa da alfavaca-cravo utilizando diferentes tipos de estacas e substratos. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 1, p. 10-13, jan./mar. 2004.

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, v. 28, n. 1, p. 5-7, 2006.

FAEGRI, K.; PJIL, L. **The principles of pollination ecology**. 3 ed. Londres: Pergamon Press, 1979. 244 p.

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

FRANÇA, F.; MELO, E.; GÓES NETO, A.; ARAÚJO, D.; BEZERRA, M. G.; RAMOS, H. M.; CASTRO, I.; GOMES, D. Flora vascular de açudes de uma região do semi-árido da Bahia, Brasil. **Acta bot. bras.**, v. 17, n. 3, p. 549-559, 2003.

FREITAS, C. V.; OLIVEIRA, P. E. Biologia reprodutiva de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae, Caesalpinioideae). **Rev. bras. bot.**, v. 25, n. 3, set. 2002.

GUERRA, M. Estrutura e diversificação dos nucléolos interfásicos em plantas. In: COLÓQUIO DE CITOGENÉTICA E EVOLUÇÃO DE PLANTAS, 1., 1985. **Anais...** Ribeirão Preto: SBG, 1985. p. 137-153.

_____. **Introdução à citogenética geral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988.

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

HAMANT, O.; MA, H.; CANDE, W. Z. Genetics of Meiotic Prophase I in Plants. Annu. **Rev. Plant Biol.**, v. 57, p. 267-302, 2006.

HARLEY, R. M. In search of *Labiatae* in Eastern Brazil. VITEX: a newsletter for Lamiaceae & Verbenaceae research. **Kew Bull.** n. 1, p. 1-10, 2000.

HARLEY, R.M. The *Labiatae* of Bahia: a preliminary check-list. **Sitientibus**, v. 15, p. 11-21, 1996.

HILTUNEN, R.; HOLM, Y. **Basil: The Genus *Ocimum***. Amisterdã: Harwood Academic Press, 1999. 167p.

HOAREAU, L.; DASILVA, E. Medicinal plants: a re-emerging health aid. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, v. 2, n. 2, p. 57-70, ago. 1999.

HOWELL, W. M. and BLACK, D. A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a one step method. **Experientia**, v. 36, p. 1014-1015, 1980.

INDEX PLANT CHROMOSOME NUMBER. Disponível em: <<http://www.mobot.mobot.org/Pick/Search/ipen.html>>. Acesso em: 05 dez. 2006.

JAVANMARDI, J.; KHALIGHI, A.; KASHI, A. BAIS, H. P.; VIVANCO, J. M. Chemical characterization of basil (*Ocimum basilicum* L.) found in local accessions and used in traditional medicines in Iran. **J. Agric. Food Chem.**, v. 50, p. 5878-5883, 2002.

JAVANMARDI, J.; STUSHNO, C.; LOCKE, E.; VIVANCO, J. M. Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian *Ocimum* accessions. **Food Chemistry**, v. 83, p. 547-550, 2003.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: Mcgraw-Hill Book Company, 1940. 523p.

JONES, N.; DÍEZ, M. **The B chromosome database**. Disponível em: <<http://www.bchromosomes.org/bdb/>>. Acesso em: 05 dez. 2006.

JONES, R. N. B-chromosome drive. **American Naturatist**, v. 137, p. 430-442, 1991.

JONES, R. N.; DÍEZ, M. The B chromosome data base. **Cytogenet. Genome Res.**, v. 106, p. 149-150, 2004.

JONES, R. N.; HOUBE, A. B chromosomes in plants: escapees from the A chromosome genome? **Trends in Plant Sciences**, v. 8, p. 417-423, 2003.

JONES, R. N.; REES, H. B chromosomes in plants. **New Phytol.**, v. 131, p. 411-434, 1995.

_____. **B chromosomes**. Londres: Academic Press, 1982. 266p.

KANDEMIR, N. The morphological, anatomical and karyological properties of endemic *Salvia hypargeia* Fich. & Mey. (*Lamiaceae*) in Turkey. **Pak. J. Bot.**, v. 35, n. 2, p. 219-236, 2003.

KEARNS, C. A.; INOUE, D. W. **Techniques for pollination biologists**. Niwot: University Press of Colorado, 1993. 583p.

KHOSLA, M. K. Inter-relationship studies of different species of the genus *Ocimum*. **Journal of Plant Anatomy Morphology**, v. 3, p.157-167, 1986.

_____. Cytomorphological study of the F[2] variants of F[1] hybrids of *Ocimum gratissimum* L. (2n=40) and *Ocimum viride* Willd. (2n=40). **Cytologia**, v. 53, n. 3, p. 561-570, 1988.

KOPTUR, S. Outcrossing and pollination limitation of fruit set: Breeding systems of neotropical *inga* trees (Fabaceae: Mimosoideae). **Evolution**, v. 38, n. 5, p.1130-1143, 1984.

KRISHNAN, R. Natural outcrossing in sweet basil, *Ocimum basilicum* L. **Industrial Perfumer**, v. 25, n. 6, p. 74-77, 1981.

KUNDU, A. K. Interspecific variation in the amount of DNA in *Ocimum* L. **Current Science**, v. 56, n. 1, p. 34-35, jan. 1987.

LAWRENCE, G. H. **Taxonomy of vascular plants**. New York: Mcgraw-Hill Book Company, 1966. 823p.

LEVIN, D. A.; PALESTIS, B. G.; JONES, R. N.; TRIVERS, R. Phyletic hot spots for b chromosomes in angiosperms. **Evolution**, v. 59, n. 5, p. 962-969, 2005.

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.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Plantarum, 2002. p. 252-254.

LOVE, R. M. Varietal differences in meiotic chromosomes behavior of Brazilian wheats. **Agron. J.**, v. 43, p. 72-76, 1951.

MAFFEI, E. M. D. **Análises citogenéticas em populações de *Mikania micrantha* HBK (Asteraceae)**. 1996. 109 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Curso de Pós-graduação em Genética e Melhoramento, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brasil.

MAFFEI, E. M. D.; MARIN-MORALES, M. A.; RUAS, P. M.; RUAS, C. F.; MATZENBACHER, N. I. Chromosomal polymorphism in 12 populations of *Mikania micrantha* (Compositae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 22, p. 433-444, 1999.

MALAGODI-BRAGA, K. S. **Estudo de agentes polinizadores em cultura de morango (*Fragaria x ananossa* Duchene – Rosaceae)**. 2002. 104 p. Tese (Doutorado em Ciências). Programa de Pós-graduação em Ciências, Área de Concentração em Ecologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.

MANFREDINI, S.; BRACCIOLI, E.; BRUNI, R. Composition and functional properties of the essential oil of Amazonian Basil, *Ocimum micranthum* Willd., *Labiatae* in comparison with commercial essential oils. **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, p. 3486-3491, 2004.

MAPELI, N. C.; VIEIRA, M. C.; HEREDIA, Z. N. A.; SIQUEIRA, J. N. Produção de biomassa e óleo essencial dos capítulos florais de camomila em função de nitrogênio e fósforo. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 1, p. 32-37, jan./mar. 2005.

MENDES, M. S. **Viabilidade do grão de pólen de *Solanum* spp.** 1994. 89 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Curso de Pós-graduação em Agronomia da Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Brasil.

MICHELANGELI, C.; MEDINA, A. M.; ARTIOLI, O.; MATA, J. Microsporogénesis y microgametogénesis de onoto (*Bixa orellana* L.). **Acta Científica Venezoellana**, v. 53, p. 171-175, 2002.

MORALES, R. M.; J. E. SIMON. New basil selections with compact inflorescence of the ornamental market. In: JANICK, J. (ed.). **New crops**. Alexandria: ASHS Press, 1996. p. 543-546.

MORI, A. S.; SILVA, L. A. M.; LISBOA, G.; CORADIN, L. **Manual de manejo do herbário fanerogâmico**. 2 ed. Ilhéus: CEPAC/CEPEC, 1989. 104p.

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

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

ORMOND, W. T.; PINHEIRO, M. C. B. Contribuição ao estudo biossintético e ecológico de *Petiveria alliaceae* L. **Rev. Bras. Biol.**, v. 34, n. 1, p. 123-142, 1974.

ORTOLANI, F. A. **Citogenética e palinologia de flor-de-maio (*Schlumbergera*)**. 2003. 38 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Curso de Pós-graduação em Agronomia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, Brasil.

PATERNIANI, E. Evolução dos Sistemas dos Vegetais. **Ciência e cultura**, v. 26, n. 5, p.476-481, 1974.

PATON, A. A synopsis of *Ocimum* L. (Labiatae) in África. **Kew Bull.**, v. 47, n. 3, p. 403-435, 1992.

PATON, A.; PUTIEVSKY, E. Taxonomic problems and cytotoxic relationships between and within varieties of *Ocimum basilicum* and related species (Labiatae). **Kew Bull.**, v. 51, n. 3, p. 1-16, 1996.

PEREIRA, J. O. P.; FREITAS, B. M. Estudo da biologia floral e requerimentos de polinização do muricizeiro (*Byrsonima crassifolia* L.). **Revista Ciência Agronômica**, v. 33, n. 2, p. 5-12, 2002.

PIRES, M. M. Y.; SOUZA, L. A.; TERADA, Y. Biologia Floral de *Croton urucurana* Baill. (Euphorbiaceae) ocorrente em vegetação ripária da ilha Porto Rico, Estado do Paraná, Brasil. **Acta Scientiarum Biological Sciences**. Maringá, v. 26, n. 2, p. 209-215, 2004.

PUSHPANGADAN, P.; SOBTI, S. N. Cytogenetical studies in the genus *Ocimum*: I. Origin of *O. americanum*, cytotaxonomical and experimental proof. **Cytologia**, Japão, v. 47, n. 3-4, p. 575-583, 1982.

PUSHPANGADAN, P.; SOBTI, S. N.; REAYATKHAN, N. Karyomorphological studies in the genus *Ocimum* L. *Basilicum* group. **The nucleous**, 18, 1975, 177-182.

RANGASWAMY-AYYANGAR, K.; VEMBU, B. Karyotype analysis of *Ocimum sanctum* Linn. **Indian Sci. Congr. Assoc. Proc.**, v. 68, n. 3, p. 101, 1981.

REEVES, A. MicroMeasure: a new computer program for the collection and analysis of cytogenetic data. **Genome**, v. 44, p. 439-443, 2001.

REEVES, A.; TEAR, J. (2000) **MicroMeasure for Windows**, version 3.3. Disponível em: <<http://www.colostate.edu/Depts/Biology/MicroMeasure>>. Acesso em: 05 dez. 2006.

RUFAS, J. S., ITURRA, P., DE SOUZA, W. AND ESPONDA, P. Simple silver staining procedure for the localization of nucleolus and nucleolar organizers under light and electron microscopy. **Arch. Biol.**, v. 93, p. 267-276, 1982.

RUVALCABA-RUIZ, D.; RODRÍGUEZ-GARAY, B. Aberrant meiotic behavior in *Agave tequilana* Weber var. azul. **BMC Plant Biology**, v. 2, 2002.

RYDING, O. Notes on sweet basil and its wild relatives (*Lamiaceae*). **Economic Botany**, v. 48, n. 1, p. 65-67, 1994.

SACCHETTI, G.; MEDICI, A.; MAIETTI, S.; RADICE, M.; MUZZOLI, M.; MANFREDINI, S.; BRACCIOLI, E.; BRUNI, R. Composition and functional properties of the essential oil of Amazonian Basil, *Ocimum micranthum* Willd., Labiatae in comparison with commercial essential oils. **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, p. 3486-3491, 2004.

SANTANA, D. G.; RAMAL, M. A. **Análise da germinação**: um enfoque estatístico. Brasília: UNB, 2004, 248 p.

SCHIFINO-WITTMANN, M. T. Poliploidia e seu impacto na origem e evolução das plantas silvestres e cultivadas. **Revista Brasileira Agrociência**, v. 10, n. 2, p. 151-157, abr./jun. 2004.

SEDGLEY, M.; SMITH, R. M. Pistil receptivity and pollentube growth in relation to the breeding system of *Eucalyptus woodwardii* (*Symphomyrtus: Myrtaceae*). **Annals of Botany**, Londres, v. 64, n. 1, p. 21-31, jul. 1989.

SEIJO, J. G.; FERNÁNDEZ, A. Karyotype analysis and chromosome evolution in South American species of *Lathyrus* (*Leguminosae*). **American Journal of Botany**, v. 90, n. 7, p. 980-987. 2003.

SHARMA, A. K.; SHARMA, A. **Chromosome techniques**: theory and practice. 3 ed. Woburn: Butterworth, 1980. p. 95-105.

SILVA, M. G. V.; SILVA, F. O.; MATOS, F. J. A. Chemical composition of leaves essential oil of *Ocimum micranthum* Willd growing Brazil Northeast, during daytime and at different stages of development. **Journal of Essential Oil Research**, 2004.

SILVA, R. M.; BANDEL, G.; FARALDO, M. I. M.; MARTINS, P. S. Biologia reprodutiva de etnovarietades de mandioca. **Scientia Agricola**, v. 58, n. 1, p. 101-107, 2001.

SILVEIRA, F. A. Monitoring pollinating wild bees. In: FREITAS, B. M.; PEREIRA, J. O. P. (Eds.) **Solitary Bees**: conservation, rearing and management for pollination. Fortaleza: Imprensa Universitária, 2004.

SIMON, J. A.; CHADWICH, A. L.; CRAKER, L. E. **Herbs**: an indexed bibliography 1970-1980. the scientific literature on selected herbs, and aromatic and medicinal plants of the temperate zone. Hamden: Archon Books, 1984. 770p.

SIMON, J. E.; MORALES, M. R.; PHIPPEN, W. B.; VIEIRA, R. F.; HAO, Z. Basil: a source of aroma compounds and a popular culinary and ornamental herb. In: J. Janick (Ed.). **Perspectives on new crops and new uses**. Alexandria: ASHS Press, 1999. p. 499-505.

SIMON, J. E.; QUINN, J.; MURRAY, R.G. Basil: A source of essential oils. In: J. Janick and J.E. Simon (Eds.). **Advances in new crops**. Portland: Timber Press, 1990. p. 484-489.

SINGH, T. P.; SHARMA, A. K. Chromosome analysis as correlated with the chemical constituents and status of two species of *Ocimum*. **Agron. Lusit.**, v. 40, n. 3, p. 287-298, 1981.

SIQUEIRA FILHO, J.A.; MACHADO, I.C. Biologia reprodutiva de *Canistrum aurantiacum* E. Morren (*Bromeliaceae*) em remanescente da floresta atlântica, nordeste do Brasil. **Acta Botânica Brasilica**, v. 15, n. 3, p. 427-443, 2001.

SOBTI, S. N.; PUSHPANGADAN, P. Studies in the genus *Ocimum*: Cytogenetics, Breeding and Production of New Strains of Economic Importance. In: _____. **Cultivation and Utilization of Aromatic Plants**. C. K. Atal and B. M. Kapur. 1982. p. 457-472.

SOUZA, M. M.; MARTINS, E. R.; PEREIRA, T. N. S.; OLIVEIRA, L. O. Reproductive studies on ipecac (*Cephaelis ipecacuanha* (Brot.) A. Rich; Rubiaceae): meiotic behavior and pollen viability. **Braz. J. Biol.**, v. 66, n. 1A, p. 151-159, 2006.

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

STEBBINS, G. L. **Chromosomal evolution in higher plants**. Londres: Addison-Wesley, 1971.

_____. **Variation and evolution in plants**. Nova York: Columbia University Press, 1950. 643 p.

SUMNER, A. T. Banding and chromosome evolution. In: _____. **Chromosome banding**. Londres: Unwin Hyman, 1990a. cap. 15, p. 311-331.

SUMNER, A. T. C-Banding and related methods. In: _____. **Chromosome banding**. Londres: Unwin Hyman, 1990b. cap. 4, p. 37-69.

SUMNER, A. T. **Chromosomes: organization and function**. Londres: Blackwell, 2003. 287 p.

TUNA, M.; GILL, K. S.; VOGEL, K. P. **Karyotype and C-Banding Patterns of Mitotic Chromosomes in Diploid Bromegrass (*Bromus riparius* Rehm)**. Crop Science, v. 41, p. 831-834, 2001.

VIEIRA, M. F.; LEITE, M. S. O.; GROSSI, J. A. S.; ALVARENGA, E. M. Biologia Reprodutiva de *Cryptostegia madagascariensis* Bojer ex Decne

(Periplocoideae, Apocynaceae), espécie ornamental e exótica do Brasil. **Bragantia**, Campinas, v.63, n. 3, p. 325-334, 2004.

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

WARD, E. J. Nondisjunction: localization of the controlling site in the maize B chromosome. **Genetics**, v. 73, p. 387-391, 1973.

WENDEL, J. F. Genome evolution in polyploids. **Plant. Mol. Biol.**, v. 42, p. 225-249, 2000.

YUNES, R. A., PEDROSA, R. C., CECHINEL-FILHO, V. Fitoterápicos e Fitofármacos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p.147-152, 2001.

ZAPATA, T. R.; ARROYO, M. T. K. Plant reproductive ecology of a secondary deciduous tropical forest in Venezuela. **Biotropica**, v. 10, p. 221-230, 1978.