



**BIOLOGIA FLORAL, TENDÊNCIAS  
REPRODUTIVAS E EFEITO ALELOPÁTICO DA  
TULASE (*Ocimum sanctum* L.)**

**OBERTAL DA SILVA ALMEIDA**

**2007**



OBERTAL DA SILVA ALMEIDA

**BIOLOGIA FLORAL, TENDÊNCIAS REPRODUTIVAS E EFEITO  
ALELOPÁTICO DA TULASE (*Ocimum sanctum* L.)**

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

Prof. *D.Sc.* Anselmo Eloy Silveira Viana

VITÓRIA DA CONQUISTA  
BAHIA-BRASIL  
2007

A449b Almeida, Obertal da Silva

Biologia floral, tendências reprodutivas e efeito alelopático da tulase (*Ocimum sanctum* L.) / Obertal da Silva Almeida. - Vitória da Conquista, UESB, 2007.

[17], 88f.: il. (Color.)

Orientadores: Cláudio Lúcio Fernandes Amaral, Eliane Mariza Dortas Maffei e Anselmo Eloy Silveira Viana

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2007.

Referências: f.73-88.

1. Planta Medicinal. 2. *Ocimum sanctum* L. 3. Fitotecnia - Tese. I. Amaral, Cláudio Lúcio Fernandes. II. Maffei, Eliane Mariza Dortas. III. Viana, Anselmo Eloy Silveira. IV. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Programa de Pós-Graduação em Agronomia. V. T.

CDD: 633.88

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 floral, tendências reprodutivas e efeito alelopático da tulase  
(*Ocimum sanctum* L.)

Autor: Obertal da Silva Almeida

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

---

Prof. Manoel Abílio de Queiroz, *D.Sc.*, UNEB

---

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

Data da realização: 18.01.2007

Estrada do Bem-Querer, Km 4 – Caixa Postal 95 – Telefone: (77) 3424-8731 – Fax: (77) 3424-  
1059 – Vitória da Conquista – BA – CEP: 45.083-900 – e\_mail: [mestrado.agronomia@uesb.br](mailto:mestrado.agronomia@uesb.br)

Aos meus amados pais, José Andrade  
Almeida e Marilene da Silva Almeida, e  
noiva Nayara Rute da Paixão Santos

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

Ao meu grande Deus, autor da minha fé, fonte de luz, inspiração e sabedoria em todos os momentos;

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos;

A Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia pelo apoio institucional e pela oportunidade de mais uma formação acadêmica;

Ao Professor Dr. Cláudio Lúcio Fernandes Amaral pela orientação, amizade, confiança e incentivo constantes;

A querida Professora Dra. Eliane Mariza DORTAS MAFFEI pelos valiosos conselhos, apoio, paciência e co-orientação;

Ao Professor Dr. Anselmo Eloy Silveira Viana pela valiosa colaboração, sugestão, dedicação e co-orientação;

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Agronomia por terem contribuído para minha formação;

Aos meus amados pais, José e Marilene, que jamais mediram incentivos para que todos os meus sonhos fossem realizados;

A minha noiva, Nayara Rute, que sempre esteve dividindo comigo as alegrias e tristezas durante esta caminhada;

A minha querida irmã, Luziana, pelo carinho e amor fraterno;

Aos meus amigos da república, Adailton, Gilson e Gutemberg, pela amizade e companheirismo;

A minha futura sogra, Midhi, pelo apoio e incentivo prestados;

Ao querido casal, Generosa e Josineto, pela pronta ajuda em todas as etapas desse trabalho, pela amizade sincera e pelo carinho;

Aos meus queridos colegas e amigos do Mestrado em Agronomia, em especial a Vitória, Paty, Pedro e Antônio pela agradável convivência, carinho, amizade e

presteza;

A todos os estagiários que colaboraram comigo para o sucesso deste trabalho, em especial Daniel e Leide;

A todos aqueles que, embora não tiveram seus nomes citados, contribuíram de alguma forma para a realização deste sonho;

Os meus mais sinceros agradecimentos.



“Talvez não tenhamos conseguido fazer o melhor,  
mas lutamos para que o melhor fosse feito.  
(...) Não somos o que deveríamos ser, não somos o que  
iremos ser, mas, graças a Deus não somos o que éramos”.  
(Martin Luther King).

## RESUMO

ALMEIDA, O. da S. **Biologia floral, tendências reprodutivas e efeito alelopático da tulase (*Ocimum sanctum* L.)**. Vitória da Conquista – BA: UESB, 2007. 88p. (Dissertação – Mestrado em Agronomia, Área de Concentração em Fitotecnia).\*

A tulase (*Ocimum sanctum* L.) é uma planta medicinal da família Lamiaceae, sendo utilizada na produção de fármacos, perfumes e cosméticos. O conhecimento do sistema reprodutivo é extremamente relevante, pois permite definir estratégias de seleção com base em cruzamentos intra e interpopulacionais. A tulase apresenta vários aleloquímicos, os quais são responsáveis pela ação medicinal e alelopática da planta. As investigações da ação alelopática é considerada como uma alternativa extremamente útil na substituição de herbicidas mais específicos e menos prejudiciais ao ambiente. O objetivo deste trabalho foi estudar a biologia floral, as tendências reprodutivas e avaliar o potencial alelopático de *O. sanctum* sobre sementes de cebola (*Allium cepa* L.), visando fornecer subsídios para programas de melhoramento e informações sobre a ação de seus aleloquímicos. As investigações foram conduzidas em área experimental da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia e no Laboratório de Genética, Campus de Vitória da Conquista, no período de março de 2005 a novembro de 2006. Foram realizados os seguintes testes: autogamia e alogamia (natural e artificial), apomixia, disponibilidade, viabilidade, conservabilidade, germinabilidade e longevidade dos grãos de pólen e receptividade dos estigmas. Para verificação do efeito alelopático as sementes de cebola foram embebidas em 6 concentrações, as quais foram designadas como tratamentos 1, 2, 3, 4, 5. Foram também embebidas sementes em água destilada, as quais foram utilizadas como controle (tratamento 6). Foram avaliadas as seguintes variáveis: porcentagem de germinação, índice de velocidade de germinação e teste de primeira contagem. Foram utilizadas 10 repetições de 20 sementes de cebola, para cada concentração dos extratos e do controle, totalizando 60 observações no delineamento estatístico inteiramente casualizado. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Duncan ( $P < 0,05$ ). A tulase apesar de se reproduzir, predominantemente, por autofecundação, pode apresentar fecundação cruzada, o que evidencia a ampla versatilidade reprodutiva dessa

---

\* Orientador: Cláudio Lúcio Fernandes Amaral, *D.Sc.*, UESB e Co-orientadores: Eliane Mariza Dortas Maffei, *D.Sc.*, UESB; e Anselmo Eloy Silveira Viana, *D.Sc.*, UESB.

espécie, acentuando a variabilidade genética, a qual é essencial para sua evolução e melhoramento genético. Foi verificado também que a tulase não apresenta potencial alelopático em condições de laboratório.

**Palavras-chave:** Planta Medicinal. Reprodução. Cruzamentos.

## ABSTRACT

ALMEIDA, O. da S. **Floral biology, reproductive tendencies and allelopathic effect of the tulasi (*Ocimum sanctum* L.)**. Vitória da Conquista - BA: UESB, 2007. 88p. (Dissertation – Master's in Agronomy, Concentration Area in Crop Science).

The tulasi (*Ocimum sanctum* L.) is a medicinal plant of the Lamiaceae family, that is used in the production of medicines, perfume and cosmetics. The knowledge of mating systems is extremely important because it allows to define selection strategies based on intra and interpopulation hybridization. The tulasi presents several allelochemicals which are responsible for the medicinal and allelopathic action of the plant. The investigations of the allelopathic action are considered as an extremely useful alternative for the substitution of more specific and less harmful herbicides to the environment. The aim of this work was to study the floral biology, the reproductive tendency and to evaluate the allelopathic potential of *O. sanctum* on onion seeds (*Allium cepa* L.), seeking to supply subsidies for plant improvement programs and information about the action of its allelochemicals. The investigations were led in experimental area of the State University of the Southwest of Bahia and in the Laboratory of Genetics, *Campus* of Vitória da Conquista, from of March of 2005 to November of 2006. The following tests were accomplished: selfcrossing and outcrossing (natural and artificial), apomixis, disponibility, viability, conservability, germinability and longevity of the pollen grains and receptivity of the stigmat. To verify the allelopathic effect the onion seeds were soaked in 6 concentrations, which it were designated as treatments 1, 2 3, 4, 5. Seeds were soaked in distilled water, which were used as control (treatment 6). The following variables were evaluated: germination percentage, index of germination speed and test of first count. 10 replications of 20 onion seeds were used for each concentration of the extracts and of the control totalizing 60 observations in the statistical design was completely randomized. The obtained results were submitted to the variance analysis and the averages compared by the test of Duncan ( $P < 0,05$ ). The tulasi in spite of reproducing predominantly by self crossing, it may present outcrossing, which evidences the wide reproductive versatility of that species, highlighting the genetic variability, which is essential for its evolution and plant breeding. It was also verified that the tulasi doesn't presents potential allelopathic under laboratory conditions.

**Keywords:** Medicinal Plant. Reproduction. Mating Systems.

---

\* Adviser: Cláudio Lúcio Fernandes Amaral, *D.Sc.*, UESB and Co-adviser: Eliane Mariza Dortas Maffei, *D.Sc.*, UESB; e Anselmo Eloy Silveira Viana, *D.Sc.*, UESB.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 2.1 - Indivíduos utilizados no estudo dos mecanismos reprodutivos em área experimental com espaçamento de 0,8m x 0,5m. Vitória da Conquista - BA, 2006. Almeida (2006).....31
- Figura 2.2 - Flores acondicionadas em tubos de Ependdorf para análise da conservabilidade polínica da tulase. Vitória da Conquista - BA, 2006. Almeida (2006).....34
- Figura 2.3 - Botões florais ensacados em sacos de polietileno providos de poros, segundo a técnica de Ormond & Pinheiro (1974). Vitória da Conquista - BA, 2006. Almeida (2006).....36
- Figura 2.4 - Autopolinização artificial em botões florais de tulase com agulha de dessecação. Vitória da Conquista - BA, 2006. Almeida (2006).....36
- Figura 2.5 - Croqui do campo experimental dos indivíduos utilizados na determinação dos mecanismos reprodutivos.....38
- Figura 2.6 - Inflorescência da tulase. Vitória da Conquista - BA, 2006. Almeida (2006).....38
- Figura 2.7 - Comparação entre duas flores da tulase com estigma bífido, à esquerda (A) e trífido, à direita (B). Barra = 1mm. Vitória da Conquista - BA, 2006. Almeida (2006).....41
- Figura 2.8 - Comparação entre dois estigmas trífido (A) e bífido (B) corados com o corante azul-de-aman. Barra = 0,5mm. Vitória da Conquista - BA, 2006. Almeida (2006).....42
- Figura 2.9 - Diferentes estádios de desenvolvimento floral da tulase. (A) - Pré-antese, (B) - Antese, (C) - Pós-antese. Barra = 1mm. Vitória da Conquista - BA, 2006. Almeida (2006).....44
- Figura 2.10 - Estimativa do número de grãos de pólen disponíveis nos diferentes horários a partir da deiscência das anteras no dia 05 de maio de 2006. Vitória da Conquista - BA.....45
- Figura 2.11 - Estimativa do número de grãos de pólen disponíveis nos diferentes horários a partir da deiscência das anteras no dia 12 de maio de 2006. Vitória da Conquista - BA.....45

Figura 2.12 - Estimativa do número de grãos de pólen disponíveis nos diferentes horários a partir da deiscência das anteras no dia 19 de maio de 2006. Vitória da Conquista - BA.....	46
Figura 2.13 - Estimativa do número de grãos de pólen disponíveis nos diferentes horários a partir da deiscência das anteras no dia 26 de maio de 2006. Vitória da Conquista - BA.....	46
Figura 2.14 - Grãos de Pólen viáveis (A) e inviáveis (B) da tulase. Vitória da Conquista - BA, 2006. Barra = 18,75µm. Almeida (2006).....	47
Figura 2.15 - Estimativa da quantidade de grãos de pólen viáveis no intervalo de 24 horas realizada no dia 05 de maio de 2006. Vitória da Conquista - BA.....	48
Figura 2.16 - Estimativa da quantidade de grãos de pólen viáveis no intervalo de 24 horas realizada no dia 12 de maio de 2006. Vitória da Conquista - BA.....	48
Figura 2.17 - Estimativa da quantidade de grãos de pólen viáveis no intervalo de 24 horas realizada no dia 19 de maio de 2006. Vitória da Conquista - BA.....	49
Figura 2.18 - Estimativa da quantidade de grãos de pólen viáveis no intervalo de 24 horas realizada no dia 26 de maio de 2006. Vitória da Conquista - BA.....	49
Figura 2.19 - Grãos de pólen corados da tulase depositados sobre o estigma com o corante azul-de-aman. Barra = 0,5mm. Vitória da Conquista - BA, 2006. Almeida (2006).....	51
Figura 2.20 - Análise da conservabilidade dos grãos de pólen pela estimativa da viabilidade polínica em intervalos de 15 em 15 dias. Vitória da Conquista - BA, 2006.....	53
Figura 3.1 - Câmara asséptica utilizada no experimento. Vitória da Conquista - BA, 2006. Almeida (2006).....	68
Figura 3.2 - Tratamentos dispostos da bancada no delineamento inteiramente casualizado. Vitória da Conquista - BA, 2006. Almeida (2006).....	69

## LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Porcentagem média da germinação polínica em tulase nos 3 estádios de desenvolvimento floral, em quatro épocas de análise. Vitória da Conquista - BA, 2006.....	52
Tabela 2.2 - Porcentagens médias da avaliação da receptividade dos estigmas utilizando dois testes nos diferentes estádios de desenvolvimento floral. Vitória da Conquista - BA, 2006.....	54
Tabela 2.3 - Resultados dos cruzamentos naturais e artificiais em <i>O. sanctum</i> . Vitória da Conquista/BA, 2006.....	56
Tabela 3.1 - Resumo da análise de variância da porcentagem de germinação (G), índice de velocidade de germinação (IVG) e teste de primeira contagem (PC) em sementes de cebola. Vitória da Conquista - BA, 2006.....	70
Tabela 3.2 - Dados médios da porcentagem de germinação, índice de velocidade da germinação (IVG) e teste de primeira contagem relativos a ação dos diferentes tratamentos em sementes de cebola. Vitória da Conquista - BA, 2006.....	71

## **LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS**

CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
G	Germinação
ISI	Índice de Auto-Incompatibilidade
IVG	Índice de Velocidade de Germinação
LABGENCON	Laboratório de Genética
OMS	Organização Mundial da Saúde
P/O	Pólen/Óvulo
PC	Primeira Contagem
SAEG	Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas
UESB	Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia



## SUMÁRIO

### CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	17
-------------------------	----

### CAPÍTULO 2

BIOLOGIA FLORAL E TENDÊNCIAS REPRODUTIVAS COM POTENCIAL DE APLICAÇÃO NO MELHORAMENTO GENÉTICO EM TULASE ( <i>Ocimum sanctum</i> L.) .....	20
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

1 INTRODUÇÃO .....	20
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	21
2.1 <i>Classificação botânica</i> .....	21
2.2 <i>Importância e utilização de O. sanctum</i> .....	23
2.3 <i>Biologia floral e mecanismos reprodutivos</i> .....	24
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	30
3.1 <i>Área experimental</i> .....	30
3.2 <i>Material experimental</i> .....	30
3.3 <i>Descrição da morfologia floral</i> .....	31
3.4 <i>Determinação dos estádios de desenvolvimento floral</i> .....	32
3.5 <i>Estudo dos grãos de pólen e do estigma</i> .....	32
3.5.1 <i>Disponibilidade dos grãos de pólen</i> .....	32
3.5.2 <i>Viabilidade dos grãos de pólen</i> .....	33
3.5.3 <i>Germinabilidade e longevidade dos grãos de pólen</i> .....	33
3.5.4 <i>Conservabilidade dos grãos de pólen</i> .....	33
3.5.5 <i>Receptividade dos estigmas</i> .....	34
3.6 <i>Estudo do sistema reprodutivo</i> .....	35
3.7 <i>Relação pólen/óvulo (P/O)</i> .....	38
3.8 <i>Índice de auto-incompatibilidade (ISI)</i> .....	39
3.9 <i>Visitantes florais</i> .....	39
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
4.1 <i>Diagnose floral</i> .....	39
4.2 <i>Determinação dos estádios de desenvolvimento flor</i> .....	42
4.3 <i>Disponibilidade Polínica</i> .....	44
4.4 <i>Viabilidade dos grãos de pólen</i> .....	47
4.5 <i>Germinação e longevidade dos grãos de pólen</i> .....	50
4.6 <i>Conservabilidade dos grãos de pólen</i> .....	52
4.7 <i>Receptividade do estigma</i> .....	53

4.8 Sistema reprodutivo .....	55
4.9 Relação pólen/óvulo (P/O).....	57
4.10 Índice de auto-incompatibilidade (ISI) .....	57
4.11 Visitantes florais.....	58
5 CONCLUSÕES .....	59

### CAPÍTULO 3

#### EFEITO ALELOPÁTICO DA TULASE (*Ocimum sanctum* L.) EM SEMENTES DE CEBOLA .....

1 INTRODUÇÃO .....	60
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	61
2.1 Alelopatia .....	61
2.2 Germinação de sementes.....	64
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	66
3.1 Local do estudo .....	66
3.2 Extrato bruto aquoso - Infusão .....	67
3.3 Variáveis avaliadas e análise estatística .....	68
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	70
4.1 Efeito alelopático sobre a germinação .....	70
5 CONCLUSÃO.....	72
REFERÊNCIAS.....	73

## CAPÍTULO 1

### 1 Introdução geral

O Brasil possui, aproximadamente, 23% das espécies vegetais existentes no planeta, apresentando, portanto uma das maiores biodiversidade vegetal da Terra, e acredita-se que pelo menos a metade destas espécies pode apresentar alguma propriedade terapêutica útil à população (MARTINS e outros, 1994).

Nas últimas décadas, tem-se observado um número cada vez maior de pessoas preocupadas com o excesso das civilizações industriais, traduzidos em danos e ameaças à integridade da saúde física, mental e moral, recorrendo a Fitoterapia num movimento quase que instintivo de reconciliação com a natureza (BIESKI, 2005). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 80% da população mundial utiliza algum fitoterápico no tratamento de alguma sintomatologia desagradável, sendo que deste total mais ou menos 30% foi por indicação médica (SILVA; CASALI, 2000; CRESTANI e outros, 2005).

Apesar de várias plantas serem utilizadas com fins terapêuticos, nem uma parte ínfima dessas plantas foi ainda estudada (MORAES e outros, 2002), principalmente, ao que se refere ao sistema reprodutivo (ALMEIDA e outros, 2004).

Dentre as plantas medicinais de grande importância encontra-se o *Ocimum sanctum* L., conhecido popularmente como tulase, planta da família Lamiaceae que ocorre freqüentemente nas Regiões Sudeste e Nordeste do país (MARTINS, 1998).

O Gênero *Ocimum*, pertencente a Família Lamiaceae, inclui aproximadamente 160 espécies, as quais são fontes de óleos essenciais

(GRAYER e outros, 1996; IOANNIDIS e outros, 2002) e substâncias aromáticas destinados à produção de fármacos, perfumes, cosméticos e temperos (SIMON e outros, 1990; MORALES; SIMON, 1996), sendo conhecidas popularmente como manjericões e alfavacas (KAMADA, 1998; MARTINS e outros, 1994; JORGE e outros, 1992). Para se obter maior produção de óleos essenciais, via hibridação, é de fundamental importância conhecer o sistema reprodutivo da espécie em busca de informações que subsidiem o programa de melhoramento genético de plantas aromáticas, condimentares e medicinais. O estudo da biologia floral associado aos mecanismos reprodutivos das espécies vegetais é muito útil tanto para subsidiar a condução de programas de melhoramento genético de plantas, pois auxiliam, tanto na definição de métodos mais apropriados a serem usados (FERREIRA e outros, 2004), quanto para o correto manejo de determinada cultura (KIILL; COSTA, 2003). As técnicas de manipulação devem ser escolhidas de acordo com as formas de reprodução, ou seja, se é sexual ou assexual ou a combinação das duas; a natureza das estruturas florais; a proporção de transferência de pólen; o grau e o tipo de auto-incompatibilidade; e o efeito da segregação sobre o vigor (FRANKEL; GALUN, 1977).

A tulase apresenta vários aleloquímicos, como: ácidos fenólicos, cumarinas, terpenóides, flavonóides, alcalóides, taninos e quinonas (SAMMBAMURTY; SUBRAHMANYAN, 2000).

A diversidade destes aleloquímicos é atribuída a fitotoxicidade sobre várias plantas, os quais são originados do metabolismo secundário dos vegetais e podem interferir na germinação de sementes e no desenvolvimento de outras plantas, por meio de sua liberação (TOKURA; NÓBREGA, 2006). Os compostos alelopáticos constituem também uma forma de comunicação, pois permitem às plantas distinção entre os organismos que lhes são prejudiciais ou benéficos (RODRIGUES; LOPES, 2001). A investigação da atividade de

diversos aleloquímicos tem despertado grande interesse, pois estudos desta natureza podem auxiliar na redução de custos da produção agrícola, com relação à utilização de defensivos agrícolas tais como: herbicidas, inseticidas e nematicidas; bem como, no que diz respeito à redução do impacto ambiental causado pelo uso desordenado e crescente de agrotóxicos (FERREIRA; ÁQUILA, 2000; HIRAI, 2003).

Do ponto de vista agrônômico, a alelopatia é de grande interesse, pois possibilita não só a seleção de plantas que possam exercer certo nível de controle sobre determinadas espécies indesejáveis, como também, o estabelecimento de espécies que não sejam fortemente alelopáticas, mas que possam compor lavouras equilibradas, com reflexos favoráveis à produtividade e longevidade das mesmas (SOUZA FILHO e outros, 1997). Assim sendo, este trabalho teve como objetivo estudar a biologia floral, as tendências reprodutivas e avaliar o potencial alelopático de *O. sanctum* sobre sementes de cebola (*Allium cepa* L.), visando fornecer subsídios para programas de melhoramento e informações sobre a ação de seus aleloquímicos.

## CAPÍTULO 2

### BIOLOGIA FLORAL E TENDÊNCIAS REPRODUTIVAS COM POTENCIAL DE APLICAÇÃO NO MELHORAMENTO GENÉTICO EM TULASE (*Ocimum sanctum* L.)

#### 1 Introdução

O Gênero *Ocimum*, pertencente a Família Lamiaceae, inclui cerca de 160 espécies, as quais são fontes de óleos essenciais (GRAYER e outros, 1996; IOANNIDIS e outros, 2002) e substâncias aromáticas destinados à produção de fármacos, perfumes, cosméticos e temperos (SIMON e outros, 1990; MORALES; SIMON, 1996), sendo conhecidas popularmente como manjericões e alfavacas (KAMADA, 1998; MARTINS e outros, 1994; JORGE e outros, 1992).

No Brasil são cultivadas, aproximadamente, 11 espécies deste gênero, dentre as quais pode-se citar: *O. basilicum*, *O. americanum*, *O. gratissimum*, e *O. tenuiflorum* (ALBUQUERQUE; ANDRADE, 1998b). A folhagem é a parte econômica, possuindo tricomas glandulares, onde ocorre a síntese e o armazenamento do óleo essencial (GUPTA; SUSHMA, 1994). Dentre as plantas medicinais de grande importância encontra-se o *Ocimum sanctum* L., conhecido popularmente como tulase, planta da família Lamiaceae, Ordem Lamiales e Classe Magnoliopsida (WATSON; DALLWITZ, 1999) que ocorre de forma cultivada freqüentemente nas Regiões Sudeste e Nordeste do país (MARTINS, 1998).

*O. sanctum* L. (sin. *O. tenuiflorum* L.) é uma planta que apresenta uma ampla distribuição geográfica, sendo relatada por levantamentos etnobotânicos, sua ocorrência na Índia, Paquistão, Austrália, Filipinas, Brasil, Arábia, Nepal,

Pérsia, Egito (MGRIEVE, 1992; BHATTACHARJEE, 1998). No Brasil, é muito cultivada na região Nordeste, onde é utilizada não só na fitoterapia, mas também como condimento (ALBUQUERQUE; ANDRADE, 1998a).

Para se obter maior produção de óleos essenciais, via hibridação, é de fundamental importância conhecer o sistema reprodutivo associado com a biologia floral da espécie em busca de informações que subsidiem o programa de melhoramento genético de plantas aromáticas, condimentares e medicinais (ALMEIDA e outros, 2004).

O fato de não terem sido encontrados na literatura consultada dados acerca das tendências reprodutivas da tulase, este trabalho teve como objetivo estudar as tendências reprodutivas de *O. sanctum* visando fornecer subsídios para programas de melhoramento, tal a grande relevância farmacológica e a condição aromática dessa planta.

## **2 Referencial teórico**

### ***2.1 Classificação botânica***

A família Lamiaceae é composta, aproximadamente, por 224 gêneros e 5600 espécies distribuídas em todo o planeta (ALMEIDA; ALBUQUERQUE, 2002). Os membros da família Lamiaceae são constituídos por, principalmente, ervas e arbustos e na família não foram encontradas epífitas, saprófitas ou parasitas (DOMINGUES-VÁZQUEZ e outros, 2002). É uma das mais importantes da Terra desde o ponto de vista etnobotânico e econômico. Muitas de suas espécies são cultivadas desde os tempos remotos devido suas propriedades aromáticas e medicinais (*Ocimum* L., *Mentha* L., *Thymus* L.), ornamentares (*Stachus* L., *Scutellaria* L.) (ALBUQUERQUE; ANDRADE,

1998a). As plantas apresentam cálice fundido em forma sino ou cone, algumas vezes bilabiadas; pétalas pentâmeras; ovário súpero tetralocular ou tetralobado com um óvulo basal cada. Normalmente, o estigma é ginobásico. O fruto é do tipo aquênios com uma semente (DOMINGUES-VÁZQUEZ e outros, 2002). Os tipos de dispersão mais comuns são: autocoria, barocoria, anemocoria, hidrocoria e várias formas de zoocoria, incluindo a dispersão por humanos (BOUMAN; MEEUSE, 1992).

O gênero *Ocimum* apresenta aproximadamente 160 espécies de hábito herbáceo e arbustivo, distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais da África, Ásia e América Central e do Sul (DARRAH, 1974; SIMON e outros, 1999; BURGOS e outros, 2004). Seus representantes são plantas anuais ou perenes que apresentam um grande polimorfismo de forma e tamanho das folhas, estrutura e inflorescências e variação na coloração da corola, anteras e estigmas. Basicamente, as folhas são opostas, simples, pecioladas e verdes. As inflorescências são terminais, plurifloras simples do tipo indefinida, racimosa, centrípeta ou monopodial. As flores são hermafroditas e pediceladas. O cálice é bilabiado, com lábio superior arredondado e côncavo. A corola é tubular, bilabiada, glabra ou pilosa, branca, branca-verdosa, rosa ou levemente purpúrea. Apresentam 4 estames, todos férteis ou 2 estéreis, com anteras dorsifixas. Ovário glabro ou ligeiramente piloso, tetralobado, com estigma bifido (ALBUQUERQUE; ANDRADE, 1998b).

No Brasil, acredita-se que há aproximadamente 11 espécies que são largamente cultivadas dentre as quais pode-se citar: *O. basilicum*, *O. americanum*, *O. gratissimum*, e *O. tenuiflorum* (ALBUQUERQUE; ANDRADE, 1998b). A folhagem é a parte econômica, possuindo tricomas glandulares, onde ocorrem a síntese e o armazenamento do óleo essencial (GUPTA; SUSHMA, 1994). Dentre as variadas espécies existentes pode-se destacar o *O. sanctum*, conhecido popularmente por tulase.



*O. sanctum* L. (sin. *O. tenuiflorum* L.) é uma planta pertencente a família Lamiaceae, Ordem Lamiales e Classe Magnoliopsida (WATSON; DALLWITZ, 1999).

## **2.2 Importância e utilização de *O. sanctum***

Os maiores constituintes da tulase são óleos voláteis como Eugenol, Carvacol, Metil-Eugenol, Cariofileno, Metil-Cravicol e Ocimine (AHMAD; KHALIQ, 2002). Esses óleos voláteis são ricos em alcalóides, flavanóides, saponinas, glicosídeos, triterpenos, taninos, ácido ascórbico e caroteno (BAQUAR, 1989; LAAKSO e outros, 1990; PINO e outros, 1998; RAJU e outros, 1999; SAMMBAMURTY; SUBRAHMANYAN, 2000).

Óleos essenciais de *O. sanctum* tiveram ação anti-fúngica em *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *A. parasiticus*, *Helmenthosporium oxysporum* and *Trichoderma viride* (PRASHAR e outros, 1994).

Os extratos obtidos de suas folhas combatem diversos fitopatógenos, como vírus e fungos, e insetos (AHMAD; KHALIQ, 2002). Eles se mostraram eficientes no combate de *Phomopsis psidii* e *P. viticola* em concentrações de 75% *in vitro*, que são fungos responsáveis pelo apodrecimento da uva (ARYA, 1998), controlaram o crescimento *in vitro* de *Pyricularia oryzae*, *Cochliobotus miyabeanus* e *Rhizoctonia solani*, que são fungos causadores de podridões, morte de plântulas, aborto de flores, podridões de armazenamento em trigo, soja, algodão, feijão, milho, arroz, cenoura, tomate, girassol, ervilha e cebola (AHMAD; PRASAD, 1995). Foram muito efetivos em *Alternarie brassicae* que causa a mancha-de-alternária em mostarda (RAM, 1997).

Na medicina, esta planta é bastante utilizada no combate de doenças em humanos e animais (AHMAD; KHALIQ, 2002). A infusão, com suas folhas, mostrou eficiência contra malária e gastrites em crianças, dores de ouvido,

febres crônicas, hemorragias, disenteria, cólicas, na destruição de vermes intestinais e estomacais, como antídoto em picadas de cobra, doenças de pele e picadas de insetos (DASTUR, 1988; BAQUAR, 1989; BHATTACHARJEE, 1998). Os extratos etanólicos inibiram a ação do vírus de Pólio tipo III em 99,90% (PARIDA e outros, 1997). Os extratos obtidos de suas folhas demonstraram ação anti-tumoral em câncer de pele em camundongos (PRASHAR e outros, 1994), efeito anti-ulcerogênico em ratos (VANISAREE; DEVAKI, 1995), potente atividade anti-oxidante (MAULIK e outros, 1997) e *in vivo* protegeu as células de ratos contra danos (GANASOUNDARI e outros, 1997).

Existem dois flavanóides de *O. sanctum* que têm se mostrado promissores na proteção, em humanos, contra radiações (DEVI e outros, 1998). Pesquisas foram realizadas e demonstraram várias propriedades de *O. sanctum*, como antiasmática (FIGUEREDO e outros, 2004), antiespasmódica, hipotensora, analgésica, antiinflamatória, antimicrobial, hepatoprotetora, sedante, hipoglicemiante (AGARWAL e outros, 1996; SINGH; MAJUNDAR, 1997; BARZAGA e outros, 2002; GUPTA; SUSHMA, 2002), antidiabética (GARCÍA e outros, 1998) e antidepressiva (YAMAHARA, 1988; ALEJO e outros, 1996).

### **2.3 Biologia floral e mecanismos reprodutivos**

O estudo da biologia floral associado aos mecanismos reprodutivos das espécies vegetais é de fundamental importância tanto para subsidiar a condução de programas de melhoramento genético de plantas, pois auxiliam tanto na definição de métodos mais apropriados a serem usados (FERREIRA e outros, 2004), quanto para o correto manejo de determinada cultura (KIILL; COSTA, 2003). As técnicas de manipulação devem ser escolhidas de acordo com as

formas de reprodução, ou seja, se é sexual ou assexual ou a combinação das duas; a natureza das estruturas florais; a proporção de transferência de pólen; o grau e o tipo de auto-incompatibilidade; e o efeito da segregação sobre o vigor (FRANKEL; GALUN, 1977).

O conhecimento da biologia floral e dos mecanismos reprodutivos de determinada espécie permite, por exemplo, desenvolver estratégias para superar as barreiras bioquímico-fisiológicas observadas nos cruzamentos (AKORODA, 1983), pois a facilidade com que os híbridos controlados podem ser reproduzidos ou os indivíduos escolhidos autofecundados representam, freqüentemente, papel importante na determinação não apenas do objetivo do programa de melhoramento, mas também dos detalhes de sua execução (ALLARD, 1971; IUCHI, 1994). Com base nos estudos da biologia floral e dos sistemas reprodutivos, pode-se ainda entender o processo de domesticação das espécies (HAMRICK, 1989), o que é extremamente relevante para vegetais que sofreram pouca ou nenhuma manipulação genética, compreender os padrões de fluxo gênico e a diferenciação genética entre e dentro de populações (BAWA, 1974; CLEGG, 1980; HAMRICK, 1989), obter informações importantes sobre os padrões de cruzamentos, a dinâmica dos processos microevolucionários e quais as melhores formas para a conservação e manejo da espécie permitindo delinear estratégias que otimizem a amostragem da variabilidade genética (OLIVEIRA e outros, 2002; LINA e outros, 2003), explicar as possíveis relações entre as plantas e o ambiente em que vivem (OLIVEIRA e outros, 2003), 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 progênies (ALLARD, 1971).

Sem contar também que aspectos relativos à flor no processo de polinização, tais como o horário de abertura plena (antese), a morfologia/estrutura externa, a classificação botânica da flor e dos órgãos reprodutivos, o horário de receptividade do estigma e de viabilidade e germinação dos grãos de pólen, os recursos e atrativos aos visitantes florais são recursos imprescindíveis para aplicação de práticas de manejo e melhoramento genético (BUENO; CAVALCANTE, 2002; SILVA e outros, 2003; RIBEIRO, 2006; SILVA e outros, 2006). A viabilidade do pólen e a receptividade do estigma podem ser determinados por meio de um grande número de técnicas (DAFNI 1992; KEARNS; INOUE, 1993). A viabilidade polínica 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 (OLIVEIRA e outros, 2001).

Apesar de existirem espécies do gênero *Ocimum* que se hibridam facilmente, há espécies em que a promoção da hibridação constitui-se 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 taxa de cruzamentos naturais é fortemente influenciada por fatores ambientais, portanto ela não é fixa, sendo sua variação associada ao componente genético e ao componente ambiental. Dentre os fatores ambientais influenciadores da taxa de cruzamentos naturais, citam-se: época de floração, direção e intensidade do vento, número e tipo de polinizadores, temperatura etc. (ALLARD, 1971). Contudo, há escassez de informações sobre eficiência das

polinizações artificiais controladas entre algumas espécies e os poucos trabalhos realizados mostram que ocorrem variações inter e intra-específicas, bem como a influência de fatores ambientais (AKORODA, 1983). A polinização artificial realizada de forma ineficiente é o principal fator que limita a produção da espécie (BONAVENTURA, 1999). Vários são os fatores que podem influenciar esta prática, dentre eles destaca-se o horário da polinização (ZAYAS, 1996; PEREIRA e outros, 2003) e a maturação do pólen (ARAÚJO e outros, 1999).

A reprodução constitui-se numa 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 (PATERNIANI, 1974).

Do ponto de vista do melhoramento genético de plantas, as espécies podem ser classificadas em autógamias (plantas de autofecundação), alógamas (plantas de fecundação cruzada) ou de sistema misto (plantas de autofecundação com uma taxa de fecundação cruzada) (FRYXELL, 1957; BRIGGS; KNOWLES, 1967; ALLARD, 1971; FAEGRI; VAN DER PIJL, 1980; HARTMANN e outros, 1990; WENDT, 2005). As espécies do gênero *Ocimum* são, no geral, de fecundação cruzada, podendo apresentar autofecundação (NATION e outros, 1992). Essa distinção é de importância primordial, uma vez que os métodos de melhoramento aplicável ao grupo de plantas autógamias são, no geral, diferentes daqueles que se aplicam às espécies alógamas (BRIGGS; KNOWLES, 1967). Contudo, a principal diferença entre esses dois sistemas reprodutivos relaciona-se à influência da endogamia, em contraposição ao acasalamento livre, ao acaso, sobre a estrutura genética das populações (ALLARD, 1971; FRANKEL; GALLUN, 1977).

Além de definir estratégias adequadas de melhoramento, o conhecimento acerca da biologia floral e do modo de reprodução das espécies

vegetais permite, ainda, 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 (ANDERSON, 1995).

Os sistemas de reprodução abrangem todos os aspectos da expressão sexual das plantas, que afetam as contribuições genéticas para as próximas gerações dos indivíduos pertencentes à espécie (SILVA e outros, 2006). Os vários tipos de sistemas sexuais podem ter diferentes implicações nas taxas de exocruzamento, nos mecanismos de polinização e no comportamento dos polinizadores (DAFNI, 1992), interferindo na manutenção da variação genética de populações naturais (SILVA e outros, 2003).

Nas populações de plantas alógamas, todas as plantas são altamente heterozigotas e, quase sem exceção, a endogamia tem como principal consequência genética o aumento da probabilidade de os indivíduos carregarem alelos semelhantes, ocasionando uma redução da variabilidade genética dentro de famílias resulta na deterioração geral do vigor e em outros efeitos adversos (FERREIRA e outros, 2004). A maioria das plantas possui adaptações que facilitam a polinização cruzada (CRUDEN, 1977). Em espécies auto-incompatíveis a fecundação cruzada é virtualmente obrigatória, porém, as espécies xenógamas, auto-compatíveis (muitas delas monóicas), estão propensas a altas taxas de auto-fecundação, que podem resultar em depressão por endocruzamento (SILVA e outros, 2006). A heterozigose parece ser característica essencial das variedades comerciais destas espécies e, conseqüentemente, esta deve ser mantida durante o programa de melhoramento ou restaurada na sua fase final. Entretanto, populações de plantas autógamas geralmente consistem de misturas de muitas linhagens estreitamente aparentadas, as quais, embora coexistindo lado a lado, permanecem mais ou menos independentes uma da outra na reprodução (ALLARD, 1971).

A apomixia caracteriza-se por ser um tipo especial de propagação vegetativa em que ocorre a produção de sementes sem que haja fecundação (RICHARDS, 1997), proporcionando assim uma oportunidade única de clonagem das plantas por meio de sementes, tendo relevante papel como ferramenta no melhoramento de plantas (HANNA; BASHAW, 1987), ao permitir a fixação de genes desejáveis independente do grau de heterozigose de seus alelos (KOLTUNOW, 1995). Além disto, a multiplicação rápida de genótipos superiores geneticamente estáveis constitui-se em uma importante estratégia de conservação do material genético na prevenção da vulnerabilidade genética resultante do uso pelos agricultores de um ou poucos genótipos em homozigose (HANNA; BASHAW, 1987).

A apomixia está, freqüentemente, associada à poliploidia e origem de espécies a partir de hibridações (NIJS; MENKEN, 1996). O controle genético da apomixia é uma temática que vem sendo discutida recentemente, tendo em vista, principalmente, a incorporação da ocorrência deste fenômeno em populações de espécies com importância agrônômica (VIELLE-CALZADA e outros, 1996, SPILLANE e outros, 2001). Entre espécies tropicais, a apomixia foi encontrada em Poaceae (CARNEIRO; DUSI, 2002), Dipterocarpaceae (KAUR e outros, 1978), Melastomataceae (RENNER, 1989, GOLDENBERG; SHEPHERD, 1998), Bombacaceae (OLIVEIRA e outros, 1992), Clusiaceae (HA e outros, 1988), Erythroxylaceae (BERRY e outros, 1991), além de Amaryllidaceae, Anacardiaceae, Araceae, Cactaceae, Euphorbiaceae, Gentianaceae, Myrtaceae e Orchidaceae (NYGREN, 1954).

### **3 Material e métodos**

#### ***3.1 Área experimental***

As investigações foram conduzidas em uma área experimental de 31,9m<sup>2</sup> e, no Laboratório de Genética (LABGENCON) 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).

No município de Vitória da Conquista, comumente as temperaturas máxima e mínima apresentam médias de, respectivamente, 25,3 e 16,1°C, a umidade relativa média é de 70%, com o índice pluviométrico médio anual de 733,9 mm, 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.

#### ***3.2 Material experimental***

As plantas utilizadas nos experimentos foram mantidas ao ar livre, sendo cultivadas em vasos com 6 litros de capacidade para o substrato, com 3 partes de solo e uma de húmus de minhoca. Foram utilizados em campo 70 indivíduos, com espaçamento de 0,8m x 0,5m (Figura 2.1).





**Figura 2.1** - Indivíduos utilizados no estudo dos mecanismos reprodutivos em área experimental com espaçamento de 0,8m x 0,5m. Vitória da Conquista - BA, 2006. Almeida (2006).

### ***3.3 Descrição da morfologia floral***

Para realização da diagnose das flores e inflorescências de *O. sanctum* foi utilizado material vivo. A morfologia externa foi descrita utilizando, com o auxílio do microscópio estereomicroscópio, o manual de Organografia de Guimarães (1981) e, Vidal e Vidal (2000), no mês de outubro de 2005. A exsicata encontra-se depositada no Herbário da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia/*Campus* de Vitória da Conquista.

### ***3.4 Determinação dos estádios de desenvolvimento floral***

Para determinação da antese foram escolhidos e marcados, aleatoriamente, dentre os 70 indivíduos, 100 botões florais, provenientes de 20 inflorescências nos quais foram feitas observações diárias da abertura, no período de 07:00 h da manhã de um dia até às 07:00 h da manhã do outro dia, por 30 dias sucessivos, no mês de novembro de 2005.

Para correlacionar os estádios de desenvolvimento da flor com a maturação dos órgãos sexuais, bem como determinar a fase ideal de coleta de grãos de pólen para serem utilizados nos cruzamentos artificiais, foi descrita a morfologia externa relacionado-a com as atividades internas: disponibilidade, viabilidade, germinabilidade e longevidade dos grãos de pólen, receptividade dos estigmas e polinização.

### ***3.5 Estudo dos grãos de pólen e do estigma***

#### ***3.5.1 Disponibilidade dos grãos de pólen***

A partir da antese, foram feitas observações para constatar qual momento em que os botões florais tinham, em média, suas anteras deiscentes. Os que se enquadravam neste parâmetro foram coletados e levados ao Laboratório de Genética. Estes tiveram suas anteras retiradas e maceradas em uma lâmina, com um bastão de vidro. Para facilitar a visualização foi adicionada uma gota do corante carmim acético, sendo posteriormente levada ao microscópio óptico, a fim de estimar a disponibilidade polínica até o final da análise (pós-antese). Estes dados foram avaliados por meio da análise de regressão.

### *3.5.2 Viabilidade dos grãos de pólen*

A viabilidade dos grãos de pólen foi analisada, pela contagem de 100 grãos de pólen selecionados ao acaso, em uma lâmina, utilizando carmim acético, segundo a técnica de Linsley e Cazier (1963), Lawrence (1966), Almeida (1986), Dafni (1992) e, Kearns e Inouye (1993). Os efeitos dos horários de coleta sobre a viabilidade polínica foram estudados por análise de regressão.

### *3.5.3 Germinabilidade e longevidade dos grãos de pólen*

Para verificação da taxa de germinabilidade dos grãos de pólen, foram feitos macerados de estigmas provenientes de flores distintas, em presença de azul-de-amã, segundo a técnica de Johansen (1940) e, ao microscópio óptico (microscopia de luz/aumento de 100 vezes), contados os grãos de pólen germinados e os não germinados.

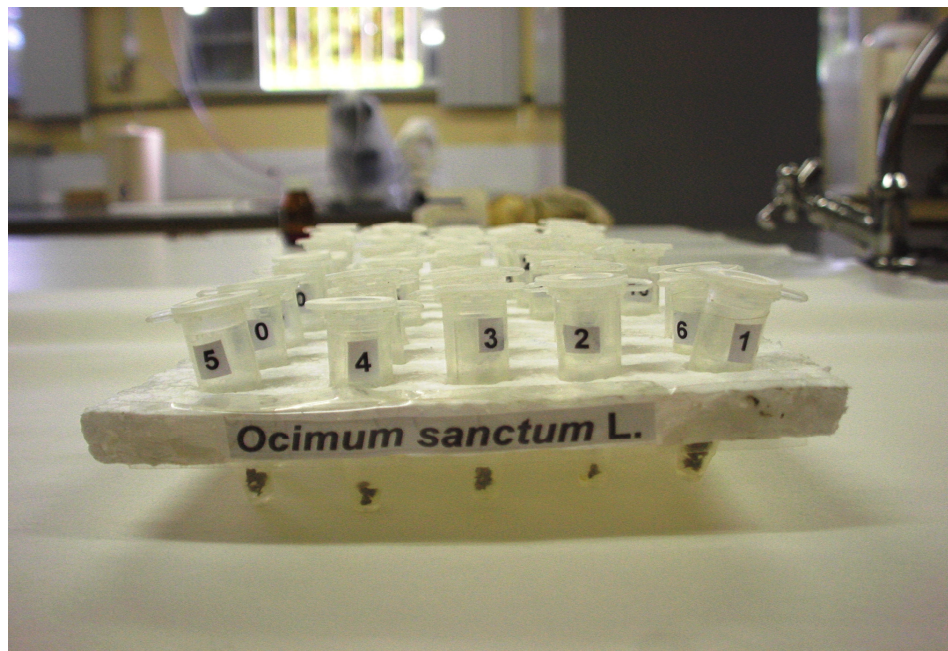
A longevidade dos grãos de pólen foi avaliada observando desde o momento de formação do primeiro tubo polínico até o último, ao longo da pré-antese, antese e pós-antese.

### *3.5.4 Conservabilidade dos grãos de pólen*

Para analisar este parâmetro, foram utilizados 50 tubos de Ependdof, os quais continham 20 anteras por tubo (Figura 2.2). Estes foram colocados em geladeira, com uma temperatura entre 5 a 7°C, por um período de 90 dias. De 15 em 15 dias foram tomadas ao acaso 100 anteras, as quais foram dissecadas para extração dos grãos de pólen a fim de obter a taxa de viabilidade nos intervalos

regulares de tempo supracitados. Os resultados foram avaliados por meio da análise de regressão.

Este estudo foi realizado no período compreendido entre 20 de junho a 19 de agosto de 2006.



**Figura 2.2** - Flores acondicionadas em tubos de Ependdorf para análise da conservabilidade polínica da tulase. Vitória da Conquista - BA, 2006. Almeida (2006).

### *3.5.5 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; INOUYE, 1993).

Os itens 3.5.1, 3.5.2, 3.5.3 e 3.5.5 foram analisados em intervalos de 3 em 3 dias, no período de 05 a 26 de maio, ao longo de 24 horas consecutivas,

num intervalo de 1 e 1 hora, sendo tomados por vez 3 flores provenientes de 3 plantas distintas nos diferentes estádios de desenvolvimento floral.

### ***3.6 Estudo do sistema reprodutivo***

O estudo dos mecanismos reprodutivos ocorreu entre os meses de março a novembro de 2006.

Para determinação da estimativa da autopolinização (autogamia) natural, foram ensacados, na pré-antese, em cada indivíduo 50 botões florais, os quais foram escolhidos de forma aleatória, totalizando 300 botões analisados. Os botões foram ensacados em sacos de polietileno providos de poros, segundo a técnica de Ormond e Pinheiro (1974) (Figura 2.3) 24 horas antes de sua abertura, ou antese.

A autopolinização (autogamia) artificial foi estimada utilizando, basicamente, o mesmo procedimento anterior, sendo a diferença o fato dos botões serem emasculados antes da deiscência das anteras e, posteriormente, polinizados manualmente, com o auxílio de uma agulha de dissecação, utilizando grãos de pólen de flores da mesma e/ou de outras inflorescências do mesmo indivíduo (Figura 2.4), sendo, em seguida, rapidamente ensacados para não ocorrer contaminação.

Para estimar a taxa de polinização cruzada (alogamia) natural foram utilizados 300 botões, os quais, após emasculados, ficaram expostos ao meio ambiente sem proteção alguma e, 24 horas depois, foram protegidos com sacos de polietileno para evitar interferências externas e observados, diariamente, até a obtenção dos frutos.



**Figura 2.3** - Botões florais ensacados em sacos de polietileno providos de poros, segundo a técnica de Ormond & Pinheiro (1974). Vitória da Conquista - BA, 2006. Almeida (2006).



**Figura 2.4** - Autopolinização artificial em botões florais de tulase com agulha de dessecação. Vitória da Conquista - BA, 2006. Almeida (2006).

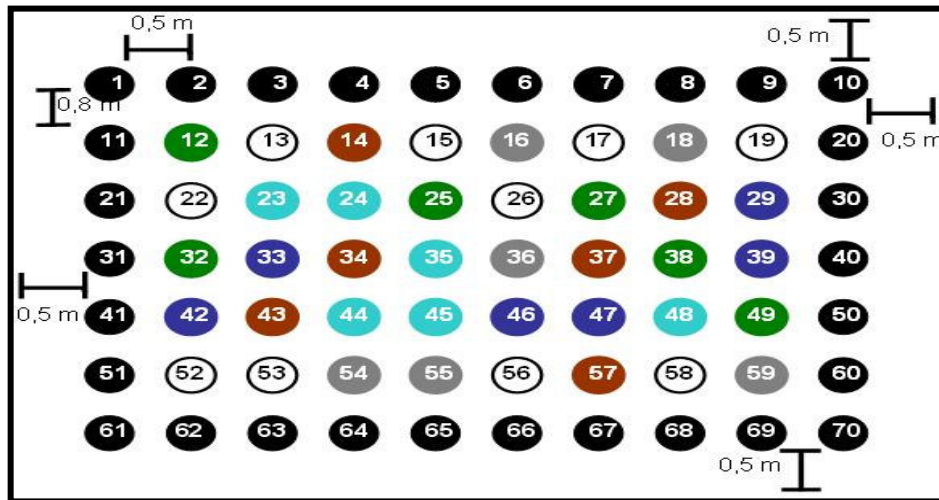
A polinização cruzada (alogamia) artificial foi testada em 300 botões florais, os quais foram totalmente emasculados e imediatamente foram artificialmente polinizados com grãos de pólen de outra planta com o auxílio de uma agulha de dissecação, a qual foi flambada a cada vez que foi usada; em seguida, os botões florais foram novamente ensacados. Foram etiquetados 50 botões, com o objetivo de estimar o percentual de frutos produzidos em condições naturais.

Foi realizado também um estudo para estimativa da apomixia, onde foram escolhidos no total 300 botões florais os quais foram emasculados (NARA; WEBBER, 2002) e tiveram o estilete cortado (GOLDENBERG; SHEPHERD, 1998) de forma que fossem eliminados os estigmas e as anteras, a fim de impedir a autopolinização e a polinização cruzada (RICHARDS, 1997). Posteriormente, estes foram protegidos com sacos de polietileno para definitivamente impossibilitar a polinização sobre o orifício feito pelo corte do estilete com o bisturi.

No final foram contadas as sementes normais (lisas e íntegras) e as anormais (murchas) dos frutos originários tanto de autogamia quanto da alogamia e também por apomixia, sendo colocadas para germinarem em placas de petri forradas com papel filtro umedecido com água destilada.

Dos 70 indivíduos utilizados no estudo, retirando as bordaduras sobraram 40, dos quais foram escolhidos, de forma aleatória, 6 indivíduos mais vigorosos para determinação de cada sistema de reprodução citado acima (autogamia natural e artificial, alogamia natural e artificial e apomixia) totalizando 30 indivíduos utilizados (Figura 2.5).

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com 5 tratamentos e 6 repetições, perfazendo 30 parcelas.



**Figura 2.5** - Croqui do campo experimental dos indivíduos utilizados na determinação dos mecanismos reprodutivos.

- - Bordadura, ● - Autogamia Natural, ● - Autogamia Artificial,
- - Alogamia Natural, ● - Alogamia Artificial, ● - Aпомixia.

### 3.7 Relação pólen/óvulo (P/O)

Foi obtida dividindo-se a média obtida do número de grãos de pólen presentes pela média do número de óvulos em uma flor, conforme metodologia descrita por Cruden (1977). A estimativa do número de grãos de pólen foi feita por meio da retirada desses de anteras indeiscentes de 20 flores de plantas distintas na pré-antese, corados com carmin acético e observados sob microscópio óptico com aumento de 100 X (KEARNS; INOUE 1993). O número de óvulos foi determinado por meio do corte da parede do ovário, com um bisturi, seguindo a contagem dos mesmos sob microscópio estereomicroscópio (16x de aumento) (SOUZA e outros, 2004).



### **3.8 Índice de auto-incompatibilidade (ISI)**

Foi calculado pela razão entre o percentual de frutificações resultantes da autopolinização natural pelo percentual de frutificações resultantes da polinização cruzada natural e pela análise da taxa de autogamia artificial (BULLOCK, 1985; DAFNI, 1992; FREITAS; OLIVEIRA, 2002).

### **3.9 Visitantes florais**

Os visitantes florais foram coletados no período das 10:00 as 13:00 h, mediante o uso de rede entomológica. Posteriormente, estes foram enviados para especialistas para serem identificados taxonomicamente, a fim de determinar os possíveis polinizadores ou pilhadores da tulase. A coleta ocorreu no mês de outubro de 2006, no intervalo entre 7 e 7 dias, totalizando 4 coletas.

## **4 Resultados e discussão**

### **4.1 Diagnose floral**

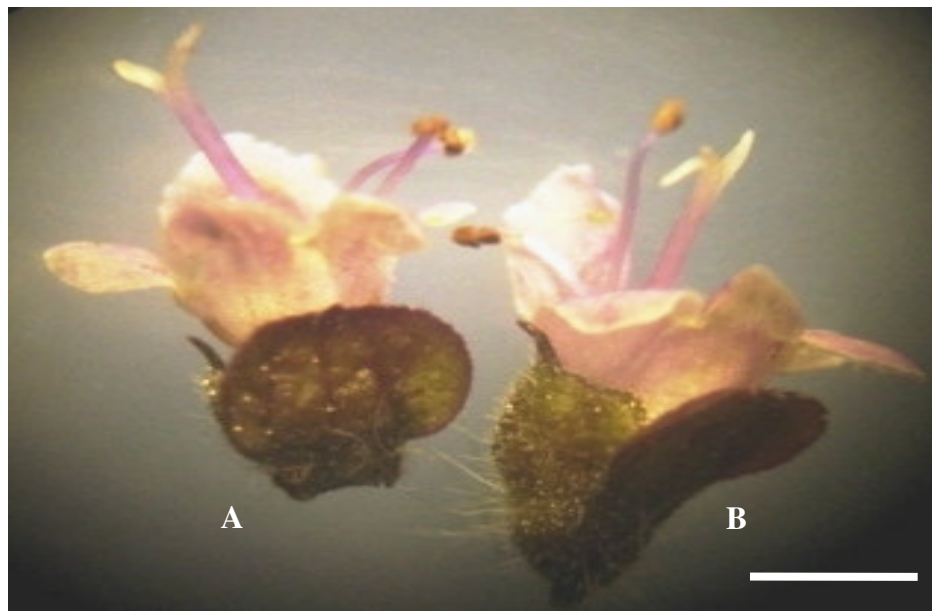
A tulase é uma espécie anual, que floresce durante todo o ano. Com base na análise floral, *O. sanctum* possui inflorescências terminais, plurifloras simples do tipo indefinida, racimosa, centrípeta ou monopodial, com flores situadas em pedicelos, saindo de diversos níveis no eixo primário e atingindo diferentes alturas, com pré-floração do tipo valvar induplicada (Figura 2.6). Na inflorescência, a qual tem 8-13 cm de comprimento, há em cada grupo de três flores há uma pequena folha. As flores têm coloração levemente rosa, sendo caracterizadas como completas, hermafroditas, cíclicas, hipóginas, diclamídeas e

heteroclamídeas. O cálice é persistente, gamossépalo, pentâmero e zigomorfo com coloração esverdeada, com alguns pêlos, principalmente na base, com o labelo do cálice oposto ao labelo da corola. A corola é gamopétala, pentâmera, zigomorfa e caduca de coloração levemente rosa. O androceu é dialistêmone, oligostêmone, didínamo e epipétalo com quatro estames; as anteras são livres, dorsifixas, ditecas e extrosas, com deiscência rimoso ou longitudinal, sendo o filete rosa e a antera amarela. O gineceu é gamocarpelar e bicarpelar, com estigma bífido de coloração branco meio rosado e com estilete ginobásico branco, o que corrobora com a descrição para o gênero, feita por Joly (1979).

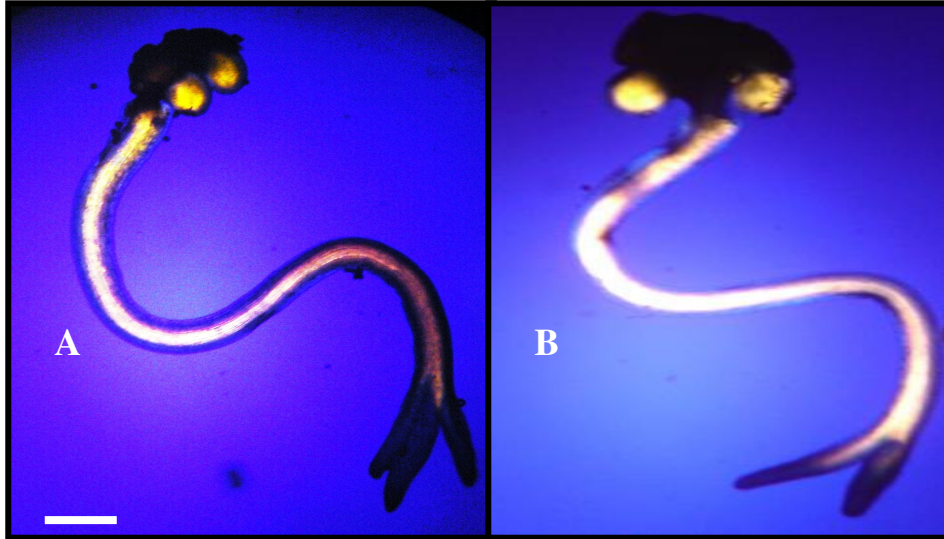
Porém, com relação a estrutura do estigma, foi verificada em 10 indivíduos avaliados, a ocorrência de certa variação morfológica, havendo no mesmo indivíduo, flores com estigma bífido e trifido (Figuras 2.7 e 2.8). Com base na literatura consultada, é característica do gênero a presença de estigma bífido. Assim, pode-se caracterizar o estigma trifido como uma mutação putativa de ocorrência natural, ou seja, espontânea. A expressão deste caráter fenotípico pode ser de grande importância, pois por meio da análise sistemática de mutações que afetam os padrões normais de desenvolvimento dos vegetais, pode-se identificar os genes que governam o desenvolvimento vegetal e a investigação de suas ações (MORAES; DERBYSHIRE, 2002; ALBERTS e outros, 1997), sem contar também que esta é uma fonte extremamente importante de variabilidade genética nas populações de seres vivos (BURNS; BOTTINO, 1991; FARALDO e outros, 2000). O ovário é súpero, tetralobado, com um disco nectarífero na base. Os frutos são tetraquênios apresentando quatro sementes pequenas, amarronzadas e ligeiramente alongadas.



**Figura 2.6** - Inflorescência da tulase. Vitória da Conquista - BA, 2006. Almeida (2006).



**Figura 2.7** - Comparação entre duas flores da tulase com estigma bífido, à esquerda (A) e trifido, à direita (B). Barra = 1mm. Vitória da Conquista - BA, 2006. Almeida (2006).



**Figura 2.8** - Comparação entre dois estigmas trifido (A) e bifido (B) corados com o corante azul-de-aman. Barra = 0,5mm. Vitória da Conquista - BA, 2006. Almeida (2006).

#### ***4.2 Determinação dos estádios de desenvolvimento flor***

A atividade floral compreendeu três estádios florais: primeiro, pré-antese, quando ocorreu a polinização; segunda, antese, quando aconteceu a abertura assincrônica de flores e terceiro, pós-antese, quando houve a fecundação dos óvulos. O processo de antese teve início por volta das 09:00h continuando ao longo da inflorescência durante todo o período luminoso, o que pode ter sido influenciado pelas condições climáticas da cidade de Vitória da Conquista. O clímax de floração, no decorrer do dia, ocorreu em média entre as 09h30min e 12:30h, o que devido ao comportamento da abertura assincrônica foi considerado com antese.

Na pré-antese, o cálice envolve todo o botão floral (Figura 2.9), não oferecendo, portanto, possibilidade de acesso a nenhum agente polinizador, o

que, segundo Almeida (1986), pode indicar autofecundação ou autogamia. Ocorre, ainda nesse estágio, a liberação dos grãos de pólen e a deposição destes sobre o estigma, que já se encontra receptivo, embora a flor permaneça fechada. Portanto, acontece a polinização, mas não a germinação dos grãos de pólen. Antes da antese, verifica-se que as bordas laterais do labelo do cálice dobram sobre si mesmas, a ponta se eleva e os lacínios laterais do cálice afastam-se do eixo central da corola, formando a abertura do cálice, liberando a corola e exteriorizando os órgãos reprodutores e assim se completa a antese (Figura 2.9).

O tempo de vida da flor se exaure após, aproximadamente, 24 horas de sua abertura. Entretanto, as flores não se abrem de maneira sincrônica na inflorescência, razão pela qual, em uma mesma planta, são encontradas flores em diferentes fases de desenvolvimento no decorrer de um dia, o que corrobora com Almeida e outros (2004), que realizaram um estudo com o *O. officinalis* e Silva e outros (2006) que encontraram resultados semelhantes estudando *O. gratissimum*.

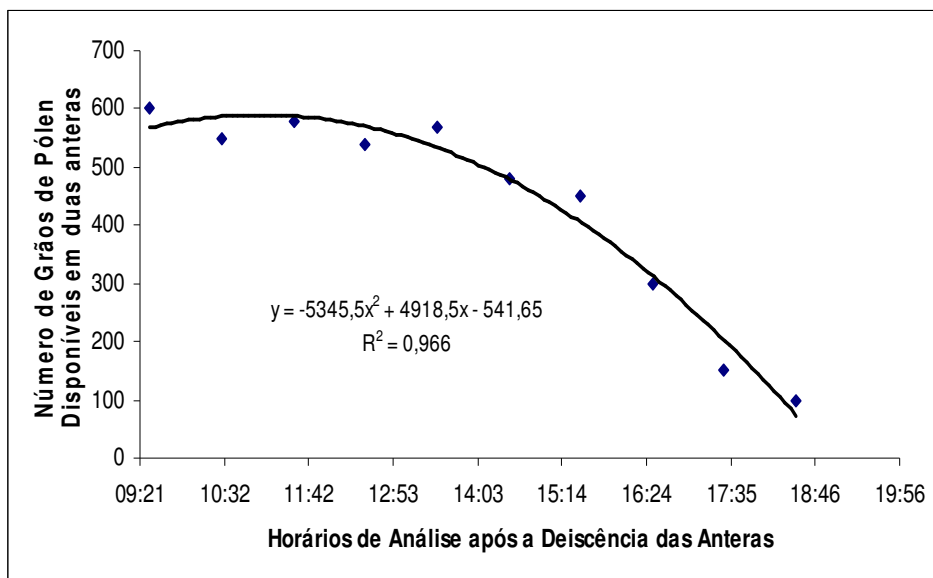
Na tulase, a antese de cada flor ocorre em espaço de tempo muito curto, o que é justificado pela rápida senescência floral, mas, em razão do assincronismo e da intermitência da abertura das flores, a atividade floral, no decorrer de um dia, mantém-se intensa, promovendo o fluxo constante de recompensa aos insetos polinizadores.



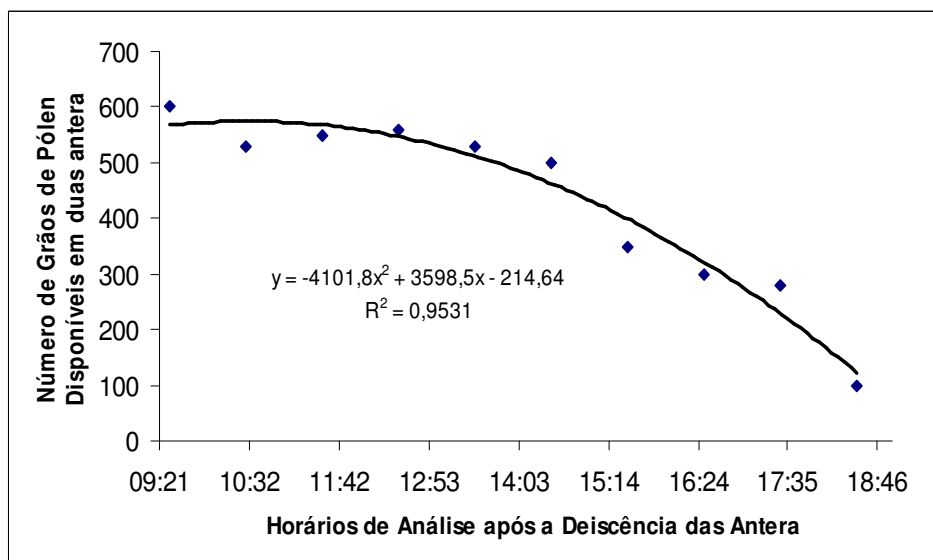
**Figura 2.9** - Diferentes estádios de desenvolvimento floral da tulase. (A) - Pré-antese, (B) - Antese, (C) - Pós-antese. Barra = 1mm. Vitória da Conquista - BA, 2006. Almeida (2006).

#### ***4.3 Disponibilidade Polínica***

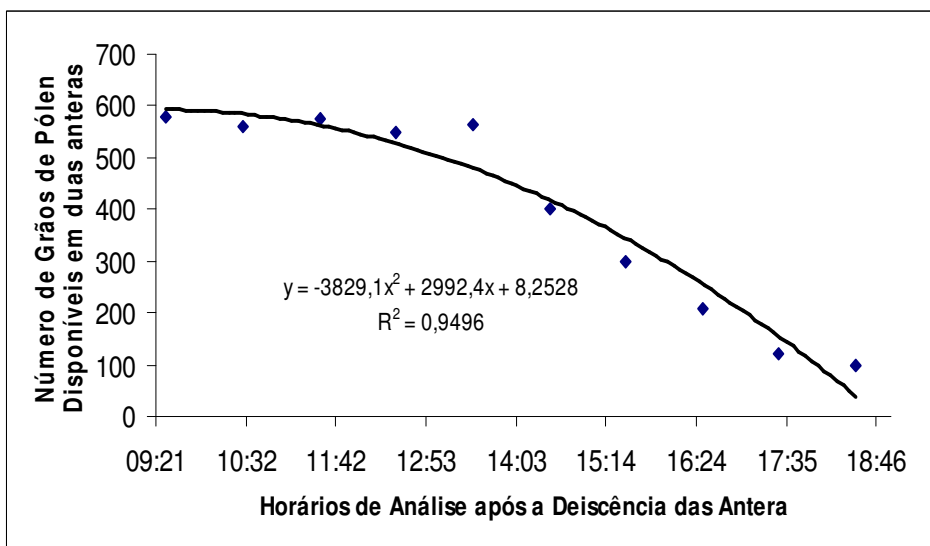
A disponibilidade polínica teve um comportamento semelhante nos diferentes dias de análise (Figuras 2.10, 2.11, 2.12, 2.13). Em média a deiscência das anteras ocorreu por volta das 09:20h. Analisando os resultados, observa-se um declínio da disponibilidade dos grãos de pólen a partir da deiscência das anteras até o final da análise (18:30 h), o que leva a supor que seja eficiente o transporte dos grãos de pólen por algum agente polinizador, o que pode promover tanto a autopolinização quanto a polinização cruzada.



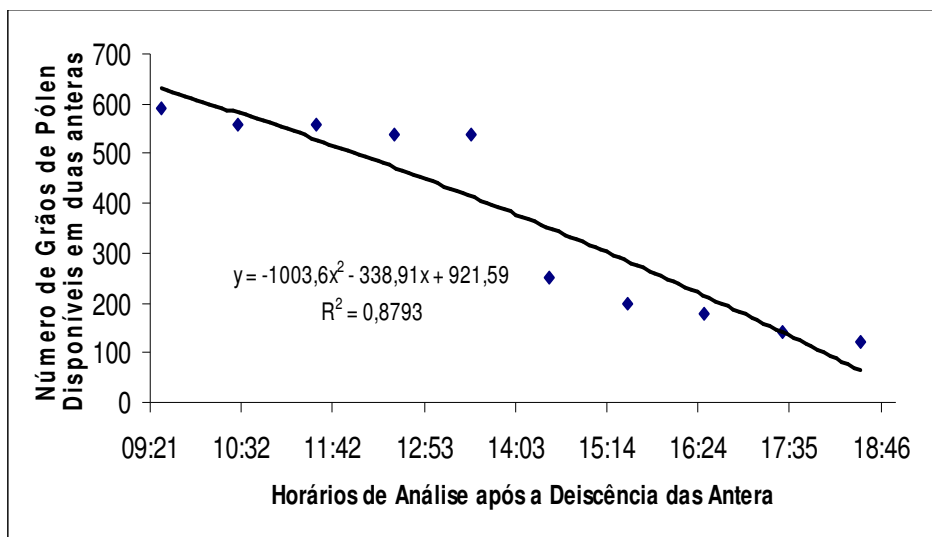
**Figura 2.10** - Estimativa do número de grãos de pólen disponíveis nos diferentes horários a partir da deiscência das anteras no dia 05 de maio de 2006. Vitória da Conquista - BA.



**Figura 2.11** - Estimativa do número de grãos de pólen disponíveis nos diferentes horários a partir da deiscência das anteras no dia 12 de maio de 2006. Vitória da Conquista - BA.



**Figura 2.12** - Estimativa do número de grãos de pólen disponíveis nos diferentes horários a partir da deiscência das anteras no dia 19 de maio de 2006. Vitória da Conquista - BA.



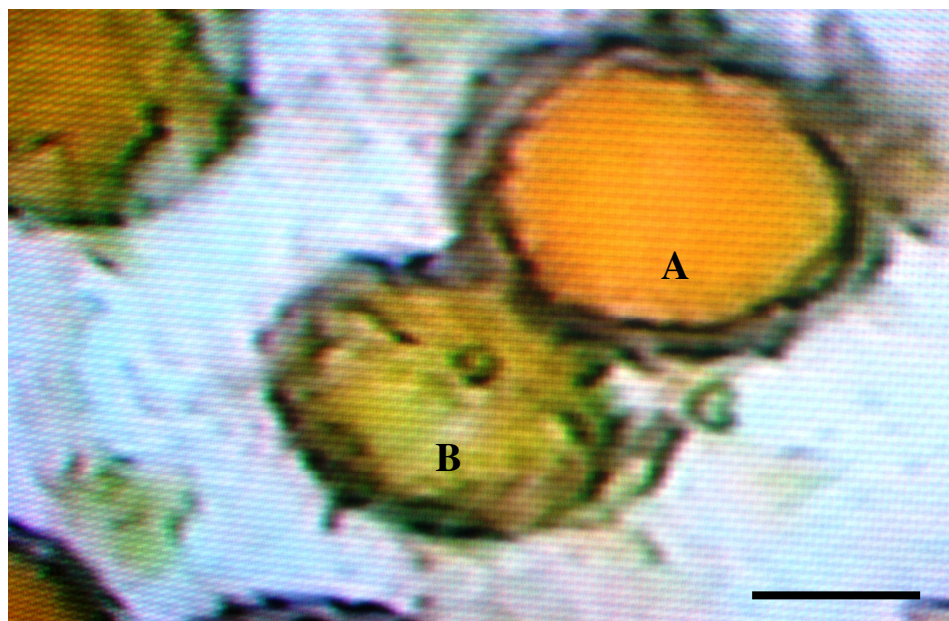
**Figura 2.13** - Estimativa do número de grãos de pólen disponíveis nos diferentes horários a partir da deiscência das anteras no dia 26 de maio de 2006. Vitória da Conquista - BA.



#### 4.4 Viabilidade dos grãos de pólen

Para estimar a viabilidade polínica foi utilizado o corante carmin acético, onde para que o grão de pólen fosse caracterizado como viável teria que apresentar-se com o citoplasma colorido de vermelho e com formato regular (Figura 2.14).

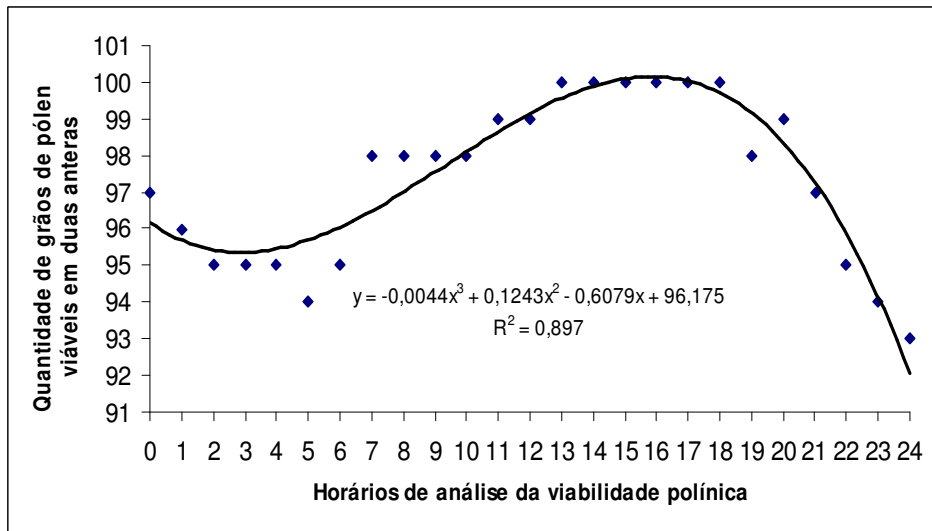
A viabilidade polínica variou ao longo dos estádios de desenvolvimento floral nos diferentes dias de análise. A análise foi realizada durante os dias 5, 12, 19 e 26 de maio de 2006. As investigações se iniciaram a partir das 18:30h de um dia até as 18:30h do outro dia, perfazendo um total de 24h de análise (Figuras 2.15, 2.16, 2.17, 2.18).



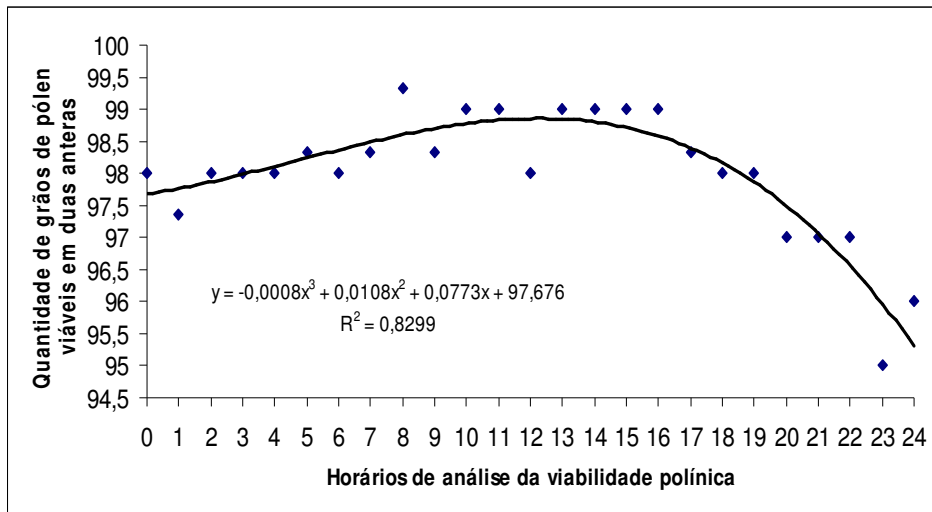
**Figura 2.14** - Grãos de Pólen viáveis (A) e inviáveis (B) da tulase. Vitória da Conquista - BA, 2006. Barra = 18,75 $\mu$ m. Almeida (2006).

Observa-se um aumento na quantidade de grãos de pólen viáveis, à medida que se aproxima da antese, o que segundo Biondo e Battistin (2001), isto

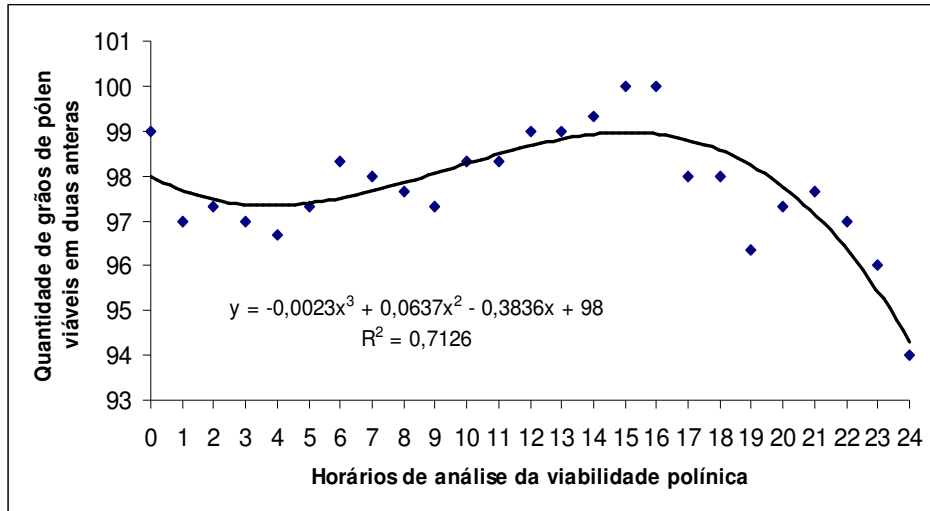
está relacionado ao alto potencial de fertilidade dos gametas masculinos, sendo que logo após começa a declinar. Estes resultados estão de acordo com os dados de disponibilidade polínica.



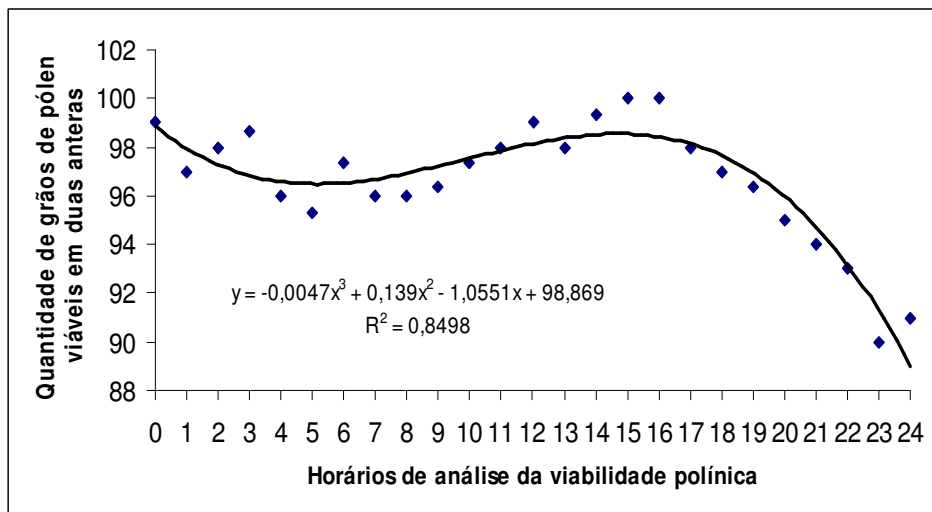
**Figura 2.15** - Estimativa da quantidade de grãos de pólen viáveis no intervalo de 24 horas realizada no dia 05 de maio de 2006. Vitória da Conquista - BA.



**Figura 2.16** - Estimativa da quantidade de grãos de pólen viáveis no intervalo de 24 horas realizada no dia 12 de maio de 2006. Vitória da Conquista - BA.



**Figura 2.17** - Estimativa da quantidade de grãos de pólen viáveis no intervalo de 24 horas realizada no dia 19 de maio de 2006. Vitória da Conquista - BA.



**Figura 2.18** - Estimativa da quantidade de grãos de pólen viáveis no intervalo de 24 horas realizada no dia 26 de maio de 2006. Vitória da Conquista - BA.

É de suma importância para o sucesso evolutivo, que na abertura da flor o grão de pólen se encontre plenamente viável; e geralmente, a medida que o tempo avança, a viabilidade vai diminuindo e reduzindo sua eficiência na fecundação e posterior fertilização (SOUZA e outros, 2002).

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). Conhecer o período de viabilidade polínica é de suma importância no melhoramento genético de plantas. Na hibridação envolvendo plantas alógamas, cada grão de pólen leva consigo a herança genética conseqüente da heterozigose, fazendo com que essas plantas não transmitam para próxima geração genótipos em que os genes estejam fixados ou em homozigose, mas sim o próprio gameta, tamanha a probabilidade de diferentes associações alélicas (SOUZA e outros, 2002).

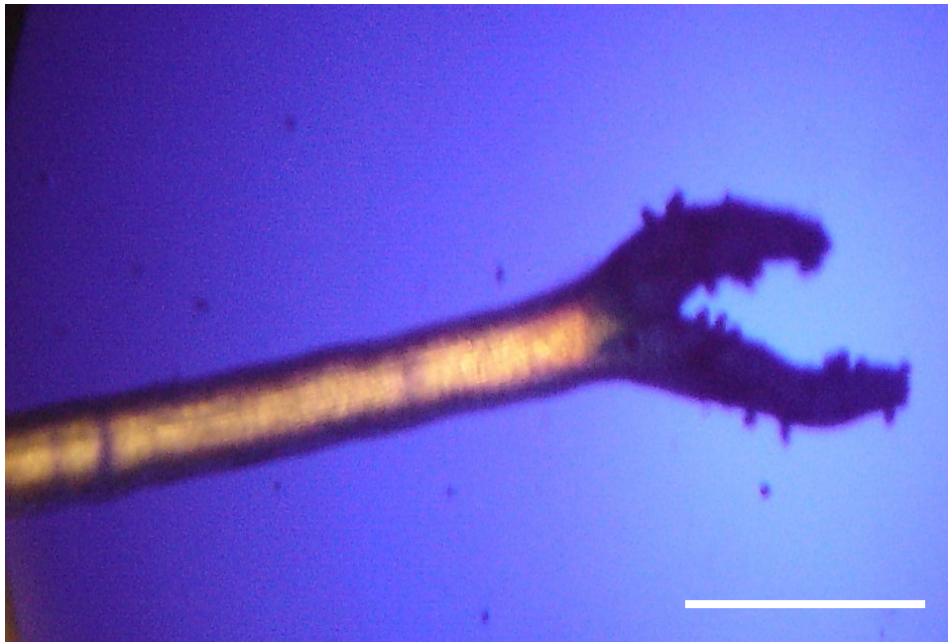
#### ***4.5 Germinação e longevidade dos grãos de pólen***

Para verificação da germinação dos grãos de pólen foram avaliados 45, 12 e 18 estigmas, na pré-antese, antese e pós-antese, respectivamente, no período de 24 horas, com início em 18:30h. Foi observado que aproximadamente, em média, a partir das 08:30 h na maioria das flores em pré-antese as anteras se encontravam deiscendo. Com isso, desse período em diante, foram encontrados grãos de pólen depositados no estigma, o qual já se encontrava receptivo (Figura 2.19).

Analisando a Tabela 2.1, verifica-se que a germinação nas condições naturais do mês em estudo, a formação do tubo polínico ocorre na pós-antese, ou seja, a fecundação e posterior fertilização acontecem nesse período, o que indica ser o melhor horário para se obter sucesso reprodutivo em cruzamentos.

Analisando a longevidade dos grãos de pólen foi verificado que esta, no

período de análise do experimento, ocorreu aproximadamente a partir das 12:30h até o final da análise às 18:30h. Este período, reflete diretamente na capacidade do pólen se manter funcional.



**Figura 2.19** - Grãos de pólen corados da tulase depositados sobre o estigma com o corante azul-de-aman. Barra = 0,5mm. Vitória da Conquista - BA, 2006. Almeida (2006).

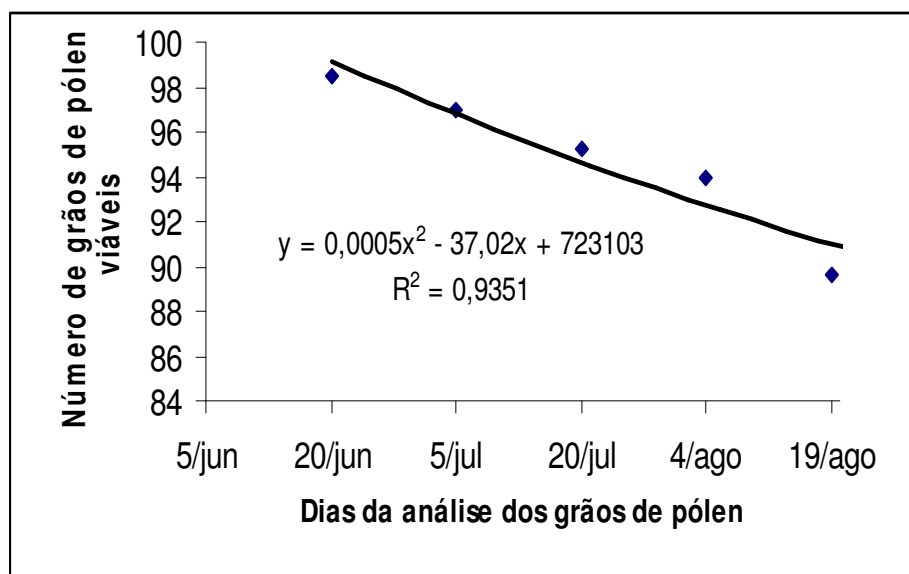
**Tabela 2.1** - Porcentagem média da germinação polínica em tulase nos 3 estádios de desenvolvimento floral, em quatro épocas de análise. Vitória da Conquista - BA, 2006.

Data	Dados médios (%) da germinação polínica nos diferentes estádios de desenvolvimento floral		
	Pré-Antese	Antese	Pós-Antese
05.05.06	0	0	20
12.05.06	0	0	22
19.05.06	0	0	21
26.05.06	0	0	22

#### **4.6 Conservabilidade dos grãos de pólen**

Os dados referentes a conservação dos grãos de pólen da tulase estão na Figura 2.20.

Em programas de melhoramento genético metodologias que otimizem a conservação dos grãos de pólen são de extrema importância, pois é necessário que estes mantenham sua viabilidade até o momento em que será utilizado em hibridações (FRANZON e outros, 2004). A análise dos resultados revelou que os grãos de pólen da tulase, conservados nas condições de geladeira, se mantiveram viáveis por um período de 90 dias. Isto demonstra que esta metodologia, de baixo custo, é uma alternativa exequível para conservação dos grãos de pólen, podendo subsidiar programas de melhoramento, viabilizando cruzamentos entre indivíduos com potencial econômico que apresentem barreiras temporais de floração, baixa taxa de polinização natural ou geograficamente separados como observado por Oliveira e outros (2001) em açazeiro.



**Figura 2.20** - Análise da conservabilidade dos grãos de pólen pela estimativa da viabilidade polínica em intervalos de 15 em 15 dias. Vitória da Conquista - BA, 2006.

#### **4.7 Receptividade do estigma**

Para verificação do período de receptividade do estigma, foram avaliados 45, 12 e 18 estigmas, na pré-antese, antese e pós-antese, respectivamente, no período de 24 horas para cada teste utilizado. Nas condições climáticas do mês de maio de 2006, com temperatura e umidade médias, respectivamente, 23,6°C e 84%, a análise da receptividade do estigma está expressa em porcentagem média na Tabela 2.2.

O período de receptividade do estigma em média, avaliado pelo teste do aspecto umectante e viscoso, começou a ser constatado por volta das 07:30 h, e utilizando o peróxido de hidrogênio a partir das 05:30 sendo estendido por todo período da análise.

A utilização do peróxido de hidrogênio na verificação da receptividade

do estigma, é um teste químico que envolve reações enzimáticas da enzima peroxidase, em que se baseia na hipótese que a presença desta enzima reflete a receptividade do estigma (PIO e outros, 2004). E com base nos resultados, este mostrou-se em média mais eficiente do que o de verificação do aspecto umectante e viscoso.

O estigma fica receptivo desde a fase da pré-antese até a pós-antese. Além disso foi verificado que este se encontrava receptivo antes da deiscência das anteras, o que caracteriza *O. sanctum* como protogínica, corroborando com resultados encontrados para o alfavacão (*O. officinalis*) (ALMEIDA e outros, 2004) e contrastando com os resultados obtidos por Sobti e Pushpangadan (1982) para algumas espécies do gênero *Ocimum*, que foram protândricas.

Para se obter êxito na polinização com posterior fecundação e fertilização, um dos fatores essenciais é a receptividade do estigma. Em alguns casos, os grãos de pólen são depositados antes deste período, fazendo com que estes permaneçam por um longo período viável para germinar, o que pode contribuir para o não sucesso evolutivo (STÖSSER e outros, 1997).

**Tabela 2.2** - Porcentagens médias da avaliação da receptividade dos estigmas utilizando dois testes nos diferentes estádios de desenvolvimento floral. Vitória da Conquista - BA, 2006.

Testes Utilizados	Data	Dados médios (%) da receptividade do estigma nos diferentes estádios de desenvolvimento floral		
		Pré-Antese	Antese	Pós-Antese
Aspecto umectante e viscoso	05.05.06	6,60	41,66	38,89
	12.05.06	8,80	58,33	44,44
	19.05.06	0,00	0,00	5,50
	26.05.06	11,10	66,67	33,33
Peróxido de Hidrogênio	05.05.06	17,77	100,00	100,00
	12.05.06	20,00	100,00	100,00
	19.05.06	20,00	100,00	94,44
	26.05.06	17,78	100,00	100,00



#### 4.8 Sistema reprodutivo

Com base na produção dos frutos, a tulase apresentou taxas de 80,17%, 14,33%, 24,83%, e 4,17% para, respectivamente, autopolinização natural e artificial, polinização cruzada natural e artificial (Tabela 2.3), o que indica que a espécie é, preferencialmente, autógama, e isto é muito importante para formação das sementes, pois por meio da autogamia elas são formadas sem que haja a necessidade de polinizações artificiais (PATERNIANI, 1974). Nesse caso, a taxa de cruzamentos é importante, porque produz contaminação de materiais genéticos. Assim, devido a ocorrência de autogamia, pode-se inferir que a espécie *O. sanctum* é autocompatível, sendo alta a viabilidade das sementes originadas por autopolinização. Espécies do gênero *Ocimum*, 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* (SOBTI; PUSHANGADAN, 1982).

Ocorreu também uma porcentagem de frutos produzidos pela fecundação cruzada, o que é extremamente importante, pois a alogamia possibilita a manutenção ou o aumento do vigor híbrido das espécies pela ocorrência de novas combinações de genes codificadores de caracteres de interesse agrônômico (PATERNIANI, 1974), como por exemplo, a produção de óleos essenciais que, por serem amplamente utilizados pelas indústrias farmacêuticas, têm alto valor no mercado nacional e internacional (NATION e outros, 1992). Como a fecundação acontece na pós-antese com a flor já aberta, é possível ocorrerem pequenas taxas de fecundação cruzada, o que condiz com o estudo feito por Khosla (1986), Krishnan (1981) e Nation e outros (1992) e contradiz com o conduzido por Darrah (1974) e Torrey (1989) em diferentes espécies do gênero *Ocimum*. Na hibridação envolvendo plantas alógamas, cada grão de pólen leva consigo a herança genética conseqüente da heterozigose,

fazendo com que essas plantas não transmitam para a próxima geração genótipos em que os genes estejam fixados ou em homozigose, mas sim o próprio gameta, tamanha a probabilidade de diferentes associações alélicas (SOUZA e outros, 2002).

Das 50 flores etiquetadas, com o objetivo de estimar o percentual de frutificações sob condições naturais, foi verificada a ocorrência de 200 frutos, com crescimento e desenvolvimento normais, significando taxa de 100% de pegamento.

Na época da polinização, a flor encontra-se fechada, significando que os grãos de pólen são compatíveis e suficientes para fecundar os óvulos da flor. Assim, ocorre cleistogamia nas flores de *O. sactum*. Este resultado condiz com o trabalho realizado com *O. officinalis* por Almeida e outros (2004).

Não foi obtido nenhum fruto na verificação da apomixia, sugerindo, portanto a não ocorrência deste sistema na tulase.

**Tabela 2.3** - Resultados dos cruzamentos naturais e artificiais em *O. sanctum*. Vitória da Conquista/BA, 2006.

Parâmetros avaliados	Sistemas Reprodutivos (Modalidades)				Apomixia
	Autogamia (Natural)	Autogamia (Artificial)	Alogamia (Natural)	Alogamia (Artificial)	
Nº Total de Flores utilizadas	300	300	300	300	300
Nº Total de Frutos esperados	1200	1200	1200	1200	1200
Nº Total de Frutos observados	962	172	298	50	0
Sucesso Reprodutivo (%)	80,17	14,33	24,83	4,17	0

#### **4.9 Relação pólen/óvulo (P/O)**

A relação pólen/óvulo está diretamente relacionada à oferta de recursos tróficos florais, ao modo de polinização e ao sistema reprodutivo dos vegetais (LENZI e outros, 2005). Plantas com fecundação cruzada (alógamas) apresentam um número maior de grãos de pólen em relação ao de óvulos, enquanto que plantas com autofecundação (autógamas) tendem a apresentar um número similar de grãos de pólen e óvulos por flor (CRUDEN, 1977).

Para *O. sanctum* a razão (P/O) é de 160, o que a classifica de acordo com Cruden (1977) como autógama facultativa, ou seja, se beneficia da autopolinização e da polinização cruzada. Isso está de acordo com os resultados obtidos nos tratamentos de polinização.

Este método constitui-se em uma alternativa rápida e de baixo custo, se comparado as técnicas de cruzamentos artificiais controlados e de marcadores moleculares, além de serem usados nos estudos de evolução dos mecanismos reprodutivos dos vegetais. Entretanto, cuidado deve ser tomado em interpretar os resultados, pois fatores como tipo, número e distribuição dos polinizadores podem afetar a quantidade de grãos de pólen produzidos pela flor (SILVA e outros, 2005).

#### **4.10 Índice de auto-incompatibilidade (ISI)**

O ISI obtido foi de 3,22%, o que significa que a tulase é ligeiramente auto-incompatível.

O percentual de frutos produzidos na autogamia artificial foi 14,33%, e este resultado indica que a tulase é parcialmente auto-compatível.

A análise dos dois resultados é aceitável, ao passo que foram obtidos

frutos provenientes das autopolinizações. No entanto, a utilização do ISI merece um pouco de cautela, pois pode ocorrer uma falsa estimativa, onde a ausência de sementes pode ser resultante da esterilidade de óvulos, embora os grãos de pólen sejam bastante compatíveis (DAFNI, 1992).

#### ***4.11 Visitantes florais***

As espécies da família Lamiaceae têm uma estrutura floral favorável à polinização por abelhas (KHOSLA, 1986). As flores de *O. sanctum* apresentam atributos florais relacionados a síndrome floral de Melitofilia (FAEGRI; VAN DER PIJL, 1980), tais como corola pouco tubulosa, odor doce, pequena distância entre a câmara nectarífera e os órgãos sexuais e antese diurna.

Os insetos que visitaram as flores de *O. sanctum* são de hábito diurno e dentre os visitantes florais coletados, cerca de 70% era a *Apis mellifera*. Ela está presente na população de tulase durante todos os meses do ano, pousando, em cada visita, em várias flores, permanecendo nelas de 5 a 10 segundos. Para o gênero *Ocimum* a *A. mellifera* é o polinizador mais comum (DARRAH, 1980; ALMEIDA e outros, 2004).

As flores, embora cleistogâmicas, recebem, normalmente, pólen exógeno por meio dos polinizadores. Um bom polinizador visita grande número de plantas de uma mesma espécie, transportando, por sua vez, numerosos grãos de pólen em seus pêlos ramificados (ALMEIDA e outros, 2004), requisito este que faz da *A. mellifera* um importante vetor de pólen para *O. sanctum*, garantido elevada produção de sementes e assegurando variabilidade genética da espécie.

## **5 Conclusões**

As investigações realizadas com a tulase, em Vitória da Conquista - BA, permitiram obter as principais conclusões:

- O horário de antese ocorre, em média, a partir das 09:30h.
- Os grãos de pólen podem ser conservados em geladeira por 90 dias sem perder significativamente a sua viabilidade.
- Não ocorre a apomixia na espécie.
- O tipo de sistema reprodutivo para a espécie é a autogamia facultativa, ou seja, se beneficia da autopolinização e da polinização cruzada.

## CAPÍTULO 3

### EFEITO ALELOPÁTICO DA TULASE (*Ocimum sanctum* L.) EM SEMENTES DE CEBOLA

#### 1 Introdução

O *Ocimum sanctum* L., conhecido popularmente como tulase, é uma planta da família Lamiaceae que ocorre freqüentemente nas Regiões Sudeste e Nordeste do país (MARTINS, 1998). Os seus maiores constituintes são óleos voláteis como Eugenol, Carvacol, Metil-Eugenol e Cariofileno (AHMAD; KHALIQ, 2002) os quais são ricos em alcalóides, flavanóides, saponinas, glicosídios, taninos, ácido ascórbico e caroteno (BAQUAR, 1989; PINO e outros, 1998; RAJU e outros, 1999; SAMMBAMURTY; SUBRAHMANYAN, 2000).

Nas últimas décadas, estudos envolvendo a análise e ação de aleloquímicos em ecossistemas naturais e manejados têm despertado o interesse de muitos pesquisadores (MARASCHIN-SILVA; AQUILA, 2005). Suas potenciais aplicações na agricultura são interessantes, uma vez que reduções na produção vegetal, principalmente, no aspecto da germinação (SCHERER e outros, 2005), causadas por plantas daninhas ou resíduos de culturas prévias podem, em alguns casos, ser atribuídas a alelopatia (BORTOLINI; FORTES, 2005). Sem contar também que a alelopatia é reconhecida como um mecanismo ecológico que influencia na sucessão vegetal primária e secundária, englobando todos os estádios sucessionais; na formação de comunidades vegetais e na dinâmica entre diferentes formações; na dominância de certas espécies vegetais, afetando na biodiversidade local bem como na produtividade e manejo de

culturas (WALLER e outros, 1993; MARASCHIN-SILVA; AQUILA, 2005).

Devido ao fato de não haver na literatura consultada dados revelando investigações alelopáticas da tulase, este trabalho teve por objetivo avaliar o potencial alelopático dos extratos aquosos de *O. sanctum* sobre sementes de cebola (*Allium cepa* L.).

## **2 Referencial teórico**

### ***2.1 Alelopatia***

O termo alelopatia vem do grego *allelon* = de um para outro, *pathós* = sofrer. O conceito descreve a influência de um indivíduo sobre o outro, seja prejudicando ou favorecendo o segundo, e sugere que o efeito é realizado por biomoléculas (denominadas aleloquímicos) produzidas por uma planta e lançadas no ambiente, seja na fase aquosa do solo ou substrato, seja por substâncias gasosas volatilizadas no ar que cerca as plantas terrestres (FERREIRA; AQUILA, 2000; TOMITA-YOKOTANI e outros, 2005). A Sociedade Internacional de Alelopatia tem definido a atividade alelopática como um processo envolvendo metabólitos especiais (aleloquímicos) produzidos por plantas, microorganismos, vírus e fungos que influenciam o crescimento e desenvolvimento de sistemas agrícolas e biológicos (ALVES e outros, 2003).

Considerando o metabolismo secundário, os vegetais produzem uma gama de aleloquímicos que são de grande importância na adaptação das espécies e na organização de comunidades vegetais (SOUZA, 2005; DAYAN e outros, 2000). Eles podem apresentar ação direta ou indireta sobre a planta alvo (PAULA, 2002). Alterações nas propriedades e características nutricionais do solo e também nas populações e/ou atividade de organismos que habitam o solo

são consideradas como efeitos indiretos. Os efeitos diretos, por sua vez, são mais estudados e compreendem alterações celulares e metabólicas, incluindo modificações no funcionamento de membranas, na absorção de nutrientes e de água, na atividade fotossintética e respiratória, na germinação entre outras (MARASCHIN-SILVA; AQUILA, 2006). Essas substâncias químicas estão presentes em diferentes órgãos, incluindo folhas, flores, frutos e gemas de muitas espécies vegetais (DELACHIAVE e outros, 1999; ANAYA e outros, 1990). Os efeitos alelopáticos são mediados por meio de substâncias químicas pertencentes a diferentes categorias de compostos, tais como fenóis, terpenos, alcalóides, poliacetilenos, ácidos graxos, peptídeos, entre outros (PERIOTTO e outros, 2004; XUAN e outros, 2005). As saponinas, os taninos e os flavonóides estão entre os aleloquímicos comumente citados como responsáveis por causarem efeitos diretos e indiretos, podendo ser liberados em condições naturais, já que são hidrossolúveis (FERREIRA; AQUILA, 2000). Sem contar também que os derivados fenólicos são notáveis pela sua capacidade de interferir com a atividade dos reguladores de crescimento, formando complexos com giberelinas, exibindo ação antagonista com o ácido abscísico ou inibindo as AIA-oxidases, aumentando assim a ação das auxinas (SOARES e outros, 2002) e alguns sesquiterpenos têm sido testados como reguladoras de crescimento de plantas. De acordo com os grupos funcionais presentes no esqueleto sesquiterpênico, podem ser observados diferentes efeitos na promoção ou inibição da germinação de sementes de diferentes espécies ou cultivares (ALVES e outros, 2003). Vale ressaltar que a inibição alelopática resulta da ação conjunta de um grupo de aleloquímicos que, coletivamente, interferem em vários processos fisiológicos e dependem da extensão dos estresses bióticos e abióticos associados, ou seja, a alelopatia está estreitamente ligada a outros estresses ambientais, incluindo temperaturas extremas, deficiências de nutrientes e de umidade, radiação, insetos, doenças e herbicidas (EINHELLIG, 1996). Essas



condições de estresse frequentemente aumentam a produção de aleloquímicos, aumentando o potencial de interferência alelopática (EINHELLIG, 1995).

O uso de herbicidas sintéticos tem suscitado insatisfações de ordem social, especialmente, por estes comprometerem a qualidade dos recursos naturais, colocarem em perigo a vida silvestre e contaminarem os alimentos da dieta humana (KHANH e outros, 2005). Esses fatores têm indicado que novos métodos de controle de plantas daninhas precisam ser estabelecidos, que sejam ao mesmo tempo eficientes no controle dessas plantas, resguardem os interesses da sociedade e não contaminem os recursos naturais (SOUZA FILHO e outros, 2005).

Os ecossistemas mantêm um equilíbrio que pode ser considerado como consequência das interações de muitos sinais químicos, de vários componentes do sistema (WARDLE e outros, 1998). Sendo parte desse sistema, as plantas vêm sendo consideradas como potenciais fontes de moléculas que podem ser utilizadas de várias formas para proteger e manter a produção agrícola (SAITO; LUCHINI, 1998).

Nesse contexto, as investigações de plantas com atividade alelopática podem ser úteis por representar excelente oportunidade na busca de fitotoxinas com potencial para compor novos produtos que possam substituir os atuais herbicidas mais específicos e menos prejudiciais ao ambiente (MACIAS e outros, 1998).

Para o efeito alelopático ser constatado, o procedimento inicial consiste na técnica do bioensaio, empregando-se material biológico como indicador da substância em estudo (INDERJIT; DAKSHINI, 1995). A resistência ou tolerância aos metabólitos secundários que funcionam como aleloquímicos é mais ou menos específica, existindo espécies mais sensíveis que outras, como por exemplo, *Lactuca sativa* L. (alface), *Allium cepa* L. (cebola), *Lycopersicon esculentum* Miller (tomate) e *Cucumis sativus* L. (pepino), são consideradas

plantas indicadoras de atividade alelopática (ALVES e outros, 2004). Para que seja indicada como planta teste a espécie deve apresentar germinação rápida e uniforme e um grau de sensibilidade que permita expressar os resultados sob baixas concentrações das substâncias alelopáticas (FERREIRA; ÁQUILA, 2000).

Diversas são as espécies vegetais que tiveram investigada seu potencial alelopático tais como: *Artemisia absinthium* L (DELACHIAVE e outros, 1999); *Mimosa caesalpinaefolia* (RODRIGUES; LOPES, 2001); *Leucaena leucocephala* (Lam.) (PIRES e outros, 2001); *Caesalpinia pluviosa* DC. (Caesalpinaceae), *Schizolobium parahyba* (Vell.) Blake (Caesalpinaceae), *Mimosa artemisiana* Heringer e Paula (Mimosaceae), *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) Macbr. (Mimosaceae), *Clitoria fairchildiana* R.A. Howard (Fabaceae) e *Erythrina speciosa* Andrews (Fabaceae) (SOARES e outros, 2002); *Coffea arábica* e *Oryza sativa* (SANTOS e outros, 2002); *Brachiaria decumbens* (SOUZA e outros, 2003); *Andira humilis* Mart. ex Benth (PERIOTTO e outros, 2004); *Plectractus amboinicus* - Lamiaceae (INGANCI e outros, 2006); *Cecropia pachystachya* Trec. (Urticaceae), *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub. (Fabaceae), *Psychotria leiocarpa* Cham. (Rubiaceae), *Sapium glandulatum* (Vell.) Pax (Euphorbiaceae) e *Sorocea bonplandii* Boer (Moraceae) (MARASCHIN-SILVA; AQUILA, 2006).

## **2.2 Germinação de sementes**

A germinação é um fenômeno biológico que pode ser considerado pelos botânicos como a retomada do crescimento do embrião, com o subsequente rompimento do tegumento pela radícula (FERREIRA; BORGHETTI, 2004). Em síntese, tendo-se uma semente viável em repouso, por quiescência ou dormência, quando são satisfeitas uma série de condições externas (do ambiente) e internas

(intrínsecas do indivíduo), ocorrerá o crescimento do qual conduzirá à germinação. Dentre os principais fatores que afetam a germinação podem-se citar os seguintes: a luz, a temperatura, a disponibilidade de água, o oxigênio etc. Referente a sensibilidade luminosa, existe uma ampla variação nas respostas germinativas (RAVEN e outros, 2001). Algumas sementes podem germinar em presença ou ausência de luz. Não só a luz como também sua interação com a temperatura vão ser fatores determinantes no processo germinativo. Assim, a temperatura exerce um importante papel na germinação de sementes fotossensíveis (sensíveis à luz). Com relação a temperatura, esta pode afetar as reações bioquímicas que determinam todo o processo germinativo. As sementes apresentam capacidade germinativa em limites bem definidos de temperatura, variável de espécie para espécie, que caracterizam sua distribuição geográfica. As temperaturas extremas (abaixo e acima da temperatura ótima) são aquelas onde as sementes não conseguem germinar mais. Há espécies que respondem bem tanto à temperatura constante como à alternada. A alternância de temperatura corresponde, provavelmente, a uma adaptação ao ambiente (SOUZA, 2005).

Entre os fatores do ambiente, a água é o fator que mais influencia o processo de germinação. Com a absorção de água, por embebição, ocorre a reidratação dos tecidos e, conseqüentemente, a intensificação da respiração e de todas as outras atividades metabólicas que resultam com o fornecimento de energia e nutrientes necessários para a retomada de crescimento por parte do eixo embrionário (VIEIRA; CARVALHO, 1994). Por outro lado, seu excesso, em geral, provoca decréscimo na germinação, visto que impede a penetração do oxigênio e reduz todo o processo metabólico resultante.

A velocidade de germinação é um dos conceitos mais difundidos sobre o vigor de sementes. Lotes de sementes com percentagens de germinação semelhantes, freqüentemente mostram diferenças em suas velocidades de

germinação, indicando que existem diferenças de vigor entre elas (VIEIRA; CARVALHO, 1994). Segundo os mesmos autores, as avaliações das plântulas, são realizadas diariamente a mesma hora, a partir do dia em que surgem as primeiras normais. Essas plântulas normais são computadas e retiradas do substrato para evitar alterações no desenvolvimento de outras plântulas. O procedimento descrito de avaliação prossegue até o dia da última contagem estabelecido pelas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 1992). Ao fim do teste, com os dados diários do número de plântulas normais, calcula-se a velocidade de germinação. Pelo IVG, quanto maior o valor obtido subentende-se maior velocidade de germinação a maior vigor, pois o índice calculado estima o número médio de sementes germinadas por dia (FERREIRA; BORGHETTI, 2004).

O teste de primeira contagem baseia-se no princípio de que as amostras que apresentam maior percentagem de germinação de plântulas normais na primeira contagem, estabelecida pelas Regras Para Análises de Sementes (BRASIL, 1992), são as mais vigorosas.

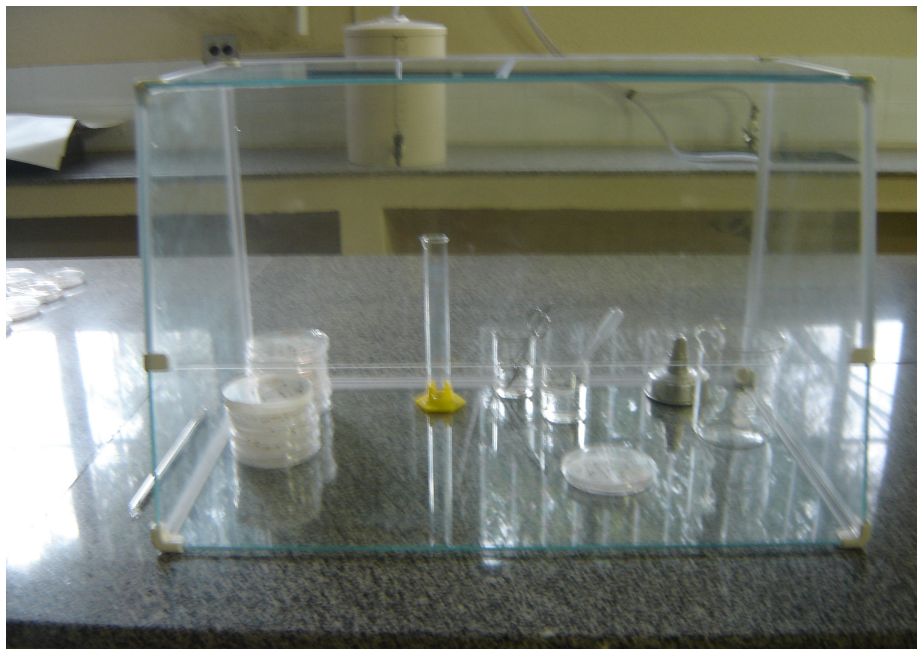
### **3 Material e métodos**

#### ***3.1 Local do estudo***

As investigações foram conduzidas no Laboratório de Genética (LABGENCON) 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), no período compreendido entre os meses de setembro a novembro de 2006.

### **3.2 Extrato bruto aquoso - Infusão**

Com base em levantamentos etnobotânicos (ALBUQUERQUE; ANDRADE, 1998 a, 1998 b) a população tradicional utiliza flores e folhas da tulase em 5 critérios básicos, a saber: ½ mão (aproximadamente 6 folhas = 0,640g), 1 mão (aproximadamente 12 folhas = 1,528g), 2 mãos (aproximadamente 25 folhas = 2,778g), 3 mãos (aproximadamente 50 folhas = 5,498g) e 4 mãos (aproximadamente 110 folhas = 12,354g), os quais foram designados, respectivamente, como tratamentos 1,2 3, 4, 5. Foram também embebidas sementes em água destilada, as quais foram utilizadas como controle (tratamento 6). O bioensaio foi realizado à temperatura ambiente e o organismo teste utilizado foram sementes de cebola. Inicialmente as folhas foram desinfestadas com hipoclorito de sódio a 1%, em seguida foram lavadas 10 vezes com água destilada, sendo posteriormente conduzidas a estufa de secagem a uma temperatura de 50°C onde permaneceram por 24h. Em seguida, cada concentração foi colocada em erlenmeyer de 500 mL e adicionada 50 mL de água destilada. Os recipientes foram hermeticamente fechados e depois foram aquecidos até alcançar a temperatura de 100°C. Logo após, foram deixados em repouso por, aproximadamente, 40 minutos, e depois deste período foi feita uma filtragem a fim de obter o extrato aquoso. Cada concentração foi colocada em becker de 500 mL, onde nestes foram adicionadas as sementes de cebola as quais permaneceram embebidas por 24h. Após este período estas foram levadas para uma capela de vidro asséptica (Figura 3.1), para evitar possíveis contaminações, na qual foram colocadas em placas de petri, com papel filtro umedecido com água destilada para prosseguir com as avaliações.



**Figura 3.1** - Câmara asséptica utilizada no experimento. Vitória da Conquista - BA, 2006. Almeida (2006).

### ***3.3 Variáveis avaliadas e análise estatística***

Foram avaliadas as seguintes variáveis: índice de velocidade de germinação (IVG), com contagens diárias até décimo segundo dia; teste de primeira contagem aos seis dias e teste de germinação, aos 12 dias segundo determina as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 1992), para sementes de cebola.

Para avaliar a germinação foram utilizadas 10 repetições de 20 sementes de cebola, para cada concentração dos extratos e do controle totalizando 60 observações, no delineamento estatístico inteiramente casualizado (Figura 3.2), sob condições ambientais, com temperaturas variando entre 21 a 25°C. A

unidade experimental consistiu de uma placa de petri com 20 sementes para as variáveis primeira contagem, germinação e IVG. Foram realizados para verificação da homogeneidade das variâncias os testes Cochran e Bartlett, e para verificação de normalidade o teste de Lilliefors e com isso as variáveis primeira contagem e germinação foram transformadas segundo arco seno de  $\sqrt{x/100}$ .



**Figura 3.2** - Tratamentos dispostos da bancada no delineamento inteiramente casualizado. Vitória da Conquista - BA, 2006. Almeida (2006).

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Duncan ( $P < 0,05$ ). As análises foram realizadas com o auxílio do Software Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas (SAEG), versão 8.1. conforme recomendações de Ribeiro Júnior (2001).

## 4 Resultados e discussão

### 4.1 Efeito alelopático sobre a germinação

Os resultados equivalentes à análise de variância e ao teste de média estão apresentados nas tabelas 3.1 e 3.2.

Analisando os resultados verifica-se que os testes não diferiram significativamente pelo teste de média, o que indica que os aleloquímicos nas concentrações utilizadas, presentes na tulase não afetaram estes parâmetros.

**Tabela 3.1** - Resumo da análise de variância da porcentagem de germinação (G), índice de velocidade de germinação (IVG) e teste de primeira contagem (PC) em sementes de cebola. Vitória da Conquista - BA, 2006.

F.V.	G. L.	Quadrados Médios		
		G	IVG	PC
Tratamento	5	203,9351*	0,3167341*	90,77632 *
Resíduo	54	85,80883	0,1779456	82,77341
Total	59			
C. V. (%)		16,592	26,316	26,101
Média		55,90	1,60	34,78

\* Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.



**Tabela 3.2** - Dados médios da porcentagem de germinação, índice de velocidade da germinação (IVG) e teste de primeira contagem relativos a ação dos diferentes tratamentos em sementes de cebola. Vitória da Conquista - BA, 2006.

<b>Tratamento</b>	<b>Germinação</b>	<b>IVG</b>	<b>Primeira Contagem</b>
1	55,0576 a	1,5792 a	34,4240 a
2	62,9400 a	1,8450 a	39,5330 a
3	58,2790 a	1,7368 a	36,6280 a
4	55,7640 a	1,6028 a	31,2820 a
5	53,3220 a	1,3287 a	32,1470 a
6	49,6230 a	1,5251 a	35,1300 a

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

De acordo com Maraschin-Silva e Aquila (2006) os extratos aquosos são misturas que podem conter substâncias de várias classes como terpenóides, fenólicos, alcalóides, aminoácidos não protéicos, dentre outras, e que apresentam efeitos complexos sobre a germinação, ainda não completamente elucidados.

Como a produção de aleloquímicos está estreitamente ligada a outros estresses ambientais (temperaturas extremas, deficiências de nutrientes e de umidade, radiação, insetos, doenças e herbicidas) (FERREIRA; AQUILA, 2000), pode-se inferir que possivelmente a tulase pode não estar sofrendo algum tipo de estresse. Adicionalmente, resultados positivos ou negativos para alelopatia, obtidos em laboratório, podem não se repetir em condições naturais (ORR e outros, 2005), devido à ocorrência simultânea de diversos fatores bióticos e abióticos que podem mascarar este fenômeno (TOMITA-YOKOTANI e outros, 2005). Para se ter uma conclusão definitiva destes resultados em condições naturais sugere-se uma investigação mais ampla, que inclui outras abordagens experimentais, principalmente testes em campo.

## **5 Conclusão**

A tulase não apresenta potencial alelopático em condições de laboratório.

## REFERÊNCIAS

AGARWAL, P.; RAI, V.; SINGH, R. B. Randomized placebo controlled, single blind trial of holy basil leaves inpatients with non insulin-dependent diabetes mellitus. **International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 34, n. 9, p. 406-409, 1996.

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. 5, n. 10, p. 1084-1087, 2002.

AHMAD, S. K.; PRASAD, J. S. Efficacy of foliar extracts against pre and post harvest diseases of sponge gourd fruits. **Letters in Applied Microbiology**, v. 21, p. 373-375, 1995.

AKORODA, M. D. Floral biology in relation to hand pollination of white yam. **Euphytica**, v. 32, n. 3, p. 831-838, 1983.

ALBERTS, B.; D. BRAY; J. LEWIS; M. RAFF; K. ROBERTS; J. D. WATSON. **Biologia molecular da célula**. 3. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997. 1294p.

ALBUQUERQUE, U. P.; ANDRADE, L. H. C. El género *Ocimum* L. (Lamiaceae) em el Nordeste del Brasil. **Annales del Jardín Botánico de Madrid**, v. 56, n.1, p. 43-64, 1998a.

\_\_\_\_\_. Etnobotânica del género *Ocimum* L. (Lamiaceae) em lãs comunidades afrobrasileñas. **Annales del Jardín Botánico de Madrid**, v. 56, n.1, p. 107-118, 1998b.

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.

ALEJO, J. L. P.; MIRANDA, R.; RODRIGUEZ, G. Actividad antidepressiva y anticonvulsivante del extrato fluido del *Ocimum tenuiflorum* L. (albahaca morada). **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 1, n.1, p.8-12, 1996.

ALMEIDA, E. C. Biologia Floral e mecanismos de reprodução em *Crotaria mucrota*, Desv. **Ceres**, v. 33, n. 190, p.528-540, 1986.

- ALMEIDA, C. F. C. B. R.; ALBUQUERQUE, U. P. Check-list of the family Lamiaceae in Pernambuco, Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 45, n. 3, p. 343-353, 2002.
- 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.
- ALVES, C. C. F.; ALVES, J. M.; SILVA, T. M. S.; CARVALHO, M. G.; NETO, J. J. Atividade alelopática de alcalóides glicosilados de *Solanum crinitum* Lam. **Floresta e Ambiente**, v. 10, n.1, p.93-97, 2003.
- ALVES, M. C. S.; FILHO, S. M.; INNECCO, R.; TORRES, S. B. Alelopatia de extratos voláteis na germinação de sementes e no comprimento da raiz de alface. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v. 39, n.11, p.1083-1086, 2004.
- ANAYA, A. L; CALERA, M. R; MATA, R.; MIRANDA, R. P. Allelopathic potential of compounds isolated from *Ipomoea tricolor* Cav. (Convolvulaceae). **Journal of Chemical Ecology**, v. 16, p. 2415-2152, 1990.
- ANDERSON, G. J. Systematics and reproductive biology. In P.C. Hoch and A. G. Stephenson (eds.), *Experimental and Molecular Approaches to Plant Biosystematics*. **Mongr. Systematics Botanical**, v. 53, p. 263-272, 1995.
- ARAÚJO, J. F.; ARAÚJO, J. F.; ALVES, A. A. C. **Instruções técnicas para o cultivo da pinha (*Annona squamosa* L.)**, Salvador: EBDA, 1999. 44p. (EBDA. Circular Técnica, 7).
- ARYA, A. Control of Phomopsis fruit rot by leaf extracts of some medicinal plants. In: \_\_\_\_\_. **Indigenous Med. Pl. Including Microbes and Fungi**. Kaushik, 1998. p. 41-46.
- BAQUAR, S. R. **Medicinal and Poisonous Plants of Pakistan**. 1989. p. 303-304.
- BARZAGA, P. G.; NÚÑEZ, Y.; CARRILO, C.; CHÁVEZ, I.; GONZÁLEZ, M. L.; GONZÁLEZ, R. Evaluación del efecto antiinflamatorio del extrato acuoso liofilizado de *Ocimum tenuiflorum* L. em ratas. **Revista Cubana de Farmácia**, v. 36, n. 2, p. 74-77, 2002. (Suplemento Especial).
- BAWA, K. S. Breeding systems of tree species for a lowland tropical

community. **Evolution**, v. 28, p. 85-92, 1974.

BERRY, P. E.; TOBE, H.; GOMEZ, J. A. Agamospermy and loss of distyly in *Erythroxylum undulatum* from Northern Venezuela. **American Journal of Botany**, v. 78, p. 595-600, 1991.

BHATTACHARJEE, S. K. **A Hand Book of Medicinal Plants**. Jaipur India: Pointer Pub., 1998. pp. 241-242.

BIESKI, I.G.C. **Plantas medicinais e aromáticas no sistema único de saúde da região sul de Cuiabá-MT**. 2005. 92f. Monografia (Pós-Graduação *Lato Sensu* em Plantas Medicinais: manejo, uso e manipulação) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

BIONDO, E.; BATTISTIN, A. Comparação da eficiência de diferentes corantes na estimativa da viabilidade de grãos de pólen em espécies dos gêneros *Eriosema* (DC.) G. Don e *Rhynchosia* Lour (Leguminosae – Faboideae), nativas na Região Sul do Brasil. **Bioikos**, v.15, n.1, p.39-44, 2001.

BONAVENTURA, L. **A cultura da cherimóia e de seu híbrido, a atemóia**. São Paulo: Nobel, 1999. 182p.

BORTOLINI, M. F.; FORTES, A. M. T. Allelopathic effects on the germination of soybean seeds (*Glycine max* L.Merrill). **Semina**, Londrina, v. 26, n. 1, p. 5-10, 2005.

BOUMAN, F.; MEEUSE, A. D. J. Dispersal in Labiatae. In: R. M. HARLEY(ed.) **Advances in Labiatae science**. Royal Botanic Gardens Kew, p.193-202, 1992.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Divisão de Laboratório Vegetal. **Regras para Análise de Sementes**. Brasília. 1992. 365p.

BRIGGS, F. N.; KNOWLES, P. F. **Introduction to plant breeding**. New York: Reinhold Publishing, 1967. 426p.

BUENO, D. M.; CAVALCANTE, K. L. Estudo da Viabilidade dos Grãos de Pólen de Flores de Melão (*Cucumis melo* L.). In: \_\_\_\_\_. CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 17., Belém. **Anais...** CBF, Belém, 2002.

BULLOCK, S. H. Breeding systems in the flora of a tropical deciduous forest. **Biotropica** v. 17, n. 4, p. 287-301, 1985.

BURGOS, A. M.; LÓPEZ, A. E.; CENÓZ, P. J. Propagación del anís de campo *Ocimum selloi* (Lamiaceae) por medio de esquejes. **Comunicaciones científicas y tecnológicas**. Universidad Nacional del Nordeste, 2004.

BURNS, G. W.; BOTTINO, P. J. **Genética**. Editora Guanabara Koogan. 6. ed. Rio de Janeiro (RJ): 1991.

CARNEIRO, V. T. C.; DUSI, D. M. A. Apomixia: em busca de tecnologias de clonagem de plantas por sementes. **Biociência**, n. 25, 2002.

CLEGG, M. T. Measuring plant mating systems. **BioScience**, n. 30, p. 814-818, 1980.

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

CRESTANI, S. C.; FREITAS, C. S.; BAGGIO, C. H.; MARQUES, M. C. A. Levantamento do uso de plantas medicinais pela comunidade do bairro Novo Mundo, Curitiba, PR, no ano de 2004. **Jornal Brasileiro de Fitomedicina**, v. 3, n. 4, p.142-148, 2005.

DAFNI, A. **Pollination ecology**: a practical approach. IRL, Oxford, 1992.

DARRAH, H. H. Investigations of the cultivars of basil (*Ocimum*). **Economic Botany**, v. 28, p. 63-67, 1974.

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

DASTUR, J. F. **Medicinal Plants of India and Pakistan**. D.B. Taraporevala Sons and Co. Private, 1988. p. 122-123,

DAYAN, F. E.; ROMAGNI, J. G.; DUKE, S. O. Investigating the mode of action of natural phytotoxins. **Journal of Chemical Ecology**, v. 26, p. 2079-2094, 2000.

DELACHIAVE, M. E. A.; RODRIGUES, J. D.; ONO, E. O. Efeitos alelopáticos de *Artemisia absinthium* L. na germinação de sementes de pepino, milho, feijão e tomate. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 21, n. 2, p. 265-269, 1999.

DEVI, P. U.; BISHT, K. S.; VINITHA, M. A comparative study of radio

protection by *Ocimum* flavonoids and synthetic aminothiols protectors in the mouse. **British Journal of Radiology**, v. 81, p. 782-784, 1998.

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

DOMINGUEZ-VÁZQUEZ, G.; BERLIN, B.; RAMÍREZ, A. E. C.; ESTRADA-LUGO, E. J. I. Revisión de la diversidad y patrones de distribución de Labiatae em Chiapas. **Anales dei Instituto de Biología**, v. 73, n. 1 p. 39-80, 2002.

EINHELLIG, F. A. Plant x plant allelopathy: biosynthesis and mechanism of action. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, 5., 1995, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 1995. p. 59-74.

EINHELLIG, F. A. Interactions involving allelopathy in cropping systems. **Agronomy Journal**, Madison, v. 88, n. 6, p. 886-893, 1996.

FAEGRI, K.; VAN DER PIJL, L. **The principles of pollination ecology**. Oxford: Pergamon Press, 1980.

FARALDO, M. I. F.; SILVA, R. M.; ANDO, A.; MARTINS, P. S. Variabilidade genética de etnovarietades de mandioca em regiões geográficas do Brasil. **Scientia Agricola**, v.57, n.3, p.499-505, 2000.

FERREIRA, A. G.; AQUILA, M. E. A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, n. 12, p.175-204, 2000. (Edição Especial).

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

FERREIRA, M. A J. da F.; QUEIROZ, M. A de; VENCOVSKY, R.; BRAZ, L. T.; VIEIRA, M. L. C. **Implicações da expressão sexual e do sistema reprodutivo de melancia em programas de pré-melhoramento**. Brasília: Embrapa, n. 65, p. 24, 2004. (Boletim de pesquisa e desenvolvimento).

FIGUEREDO, Y. N.; FERNÁNDEZ, P. B.; DOMÍNGUEZ, C. C.; VALDÉS, H. L.; HERNÁNDEZ, I. C.; MENA, D. F.; SANABRIA, M. L. G. Efecto del extrato acuoso liofilizado de *Ocimum tenuiflorum* L. sobre la anafilaxia pasiva cutânea, espasmo y tonicidad bronquial. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 9, n. 3, 2004.

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

FRANZON, R. C.; CORRÊA, E. R.; RASEIRA, M. C. B. Teste de germinação *in vitro* e conservação de pólen de feijoa. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 18., 2004, Florianópolis. **Anais...**, 2004.

FREITAS, C. V.; OLIVEIRA, P. E. Biologia reprodutiva de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae, Caesalpinioideae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 25, n. 3, p.311-321, 2002.

FRYXELL, P. A. Mode of reproduction of higher plants. **Botanical Review**, v. 23, p. 135-233, 1957.

GANASOUNDARI, A.; ZARE, S. M.; DEVI, P. U. Modification of bone marrow radio sensitivity by medicinal plant extracts. **British Journal of Radiology**, v. 70, p. 599-602, 1997.

GARCÍA, D.; SÁNCHEZ, E.; CRESPO, M.; PUPO, S.; ECHEVARRÍA, I. Estudio farmacognóstico de *Ocimum tenuiflorum* L. (Albahaca Morada). **Rev cubana plant med.**, v. 3, n. 2, p. 73-78, 1998.

GOLDENBERG, R.; SHEPHERD, G. J. Studies on the reproductive biology of Melastomataceae in cerrado vegetation. **Plant Systematics and Evolution**, v. 211, p. 13-29, 1998.

GRAY, R. J.; KITE, G. C.; GOLSDSTONE, F. J.; BRYAN, P. A.; PUTIEVSKY, E. Intraspecific taxonomy and essential oil chemotypes in sweet basil, *Ocimum basilicum*. **Phytochemistry**, v. 4, p.1033-1039, 1996.

GUIMARÃES, J. L. **Organografia Vegetal: morfologia externa relacionada com as Angiospermas e Gimnospermas**. 2. ed. Rio de Janeiro: Imprensa Universitária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1981. 156p.

GUPTA, S. K.; SUSHMA, J. S. Validation of traditional claim of tulsi *Ocimum sanctum* Linn. as a medicinal plant. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 40, p. 765-773, 1994.

HA, C. O.; SANDS, V. E.; SOEPADMO, E.; JONG, K. Reproductive patterns of selected understorey trees in the Malaysian rain forest: the apomictic species. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 97, p. 317-331, 1988.

HAMRICK, J. L. Isozymes and analysis of genetic structure in plant



populations. In: \_\_\_\_\_. **Isozymes and the analysis of genetic structure in plant populations.** (D.E. Soltis & P. Soltis, eds). New York: Chapman and Hall, 1989. p. 87-105.

HANNA, W. W.; BASHAW, E. C. Apomixis: its identification and use in plant breeding. **Crop Sci**, v. 27, p. 1136-1139, 1987.

HARTMANN, H. T. M.; KESTER, D. E.; DAVIES JUNIOR, F. T. **Plant propagation: principles and practices.** 5. ed. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 1990. 647p.

HIRAI, N. Application of allelochemicals to agriculture. **Biological Sciences in Space**, v. 17, n. 1, p. 4-5, 2003.

INDERJIT, K. M. N.; DAKSHINI, K. M. N. Algal Allelopathy. **The Botanical Review - The New York Botanical Garden**, v. 61, n. 1, p. 28-44. 1995.

IGANCI, J. R. V.; BOBROWSKI, V.L.; HEIDEN, G.; STEIN, V. C.; ROCHA, B.H.G.. Efeito do extrato aquoso de diferentes espécies de boldo sobre a germinação e índice mitótico de *Allium cepa* L. **Arq. Inst. Biol.**, v. 73, n. 1, p. 79-82, 2006.

IOANNIDIS, D.; BONNER, L. and JOHNSON, C. B. UV-B is Required for Normal Development of Oil Glands in *Ocimum basilicum* L. (Sweet Basil). **Annals of Botany**, v. 90, p. 453-460, 2002.

IUCHI, V. L. **Morfologia, biologia floral, propagação e crescimento de “rainha do abismo” (*Sinningia leucotrichia* (Hoene) Moore).** 1994. 168p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

JOHANSEN, D. A. **Plant Microtechnique.** New York: McGraw-Hill, 1940. 523p.

JOLY, A. B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal.** 5. ed. Nacional, São Paulo, 1979. 777p.

JORGE, L. I. F.; ROQUE, N. F.; FERRO, V. O. *Ocimum micranthum* Willd- manjeriço do Brasil: caracterização histológica e química. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 52, n. 1/2, p. 47-50, 1992.

KAMADA, T. **Plasticidade fenotípica da morfologia e do óleo essencial em acessos de manjeriço (*Ocimum* spp.).** 1998. 59p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

KAUR, A.; HA, C. O.; JONG, K.; SANDS, V. E.; CHAN, H. T.; SOEPADMO, E.; ASHTON, P. S. Apomixis may be widespread among trees of the climax rain forest. **Nature**, v. 271, p. 440-442, 1978.

KHANH, T. D.; CHUNG, I. M.; XUAN, T.D.; TAWATA, S. The exploitation of crop allelopathy in sustainable agricultural production. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 191, p.172-184, 2005.

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

KIILL, L. H. P.; COSTA, J. G. da. Biologia floral e sistema de reprodução de *Annona squamosa* L. (Annonaceae) na região de Petrolina-PE. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, n. 5, p. 851-856, 2003.

KHOSLA, M. K. Inter-relationship studies of different species of the genus *Ocimum*. **J. Plant Anat. Morphol.**, Jodhpur, n. 3, p. 157-167, 1986.

KOLTUNOW, A. M. Apomixis: embryos sacs and embryos formed without, meiosis or fertilization in ovules. **The plant cell**, v. 5, p. 1425-1437, 1995.

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

LAAKSO, I.; SEPPANEN-LAAKSO, T.; HERRMANN-WOLF, B.; KUHNEL, N.; KNOBLOCH, K. Biology and chemistry of active natural substances. **Plant Med.**, v. 56, n. 6, p. 493-698, 1990.

LAWRENCE, G. H. **Taxonomy of Vascular Plants**. New York: Mcgraw-Hill, 1966, 823p.

LENZI, M; ORTH, A. I.; GUERRA, T. M. Ecologia da polinização de *Momordica charantia* L. (Cucurbitaceae), em Florianópolis, SC, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 28, n. 3, p. 505-313, 2005.

LINA, M. F. I. S.; KAGEYAMA, P. Y.; SEBBENN, A. M. Sistemas de reprodução em população natural de *Chorisia speciosa* A. St.-Hil. (Bombacaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 26, n. 1, p. 113-121, 2003.

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

MACIAS, F. A.; SIMONET, A. M.; GALINDO, J. C. G.; PACHECO, P. C.; SÁNCHEZ, J. A. Bioactive polar triterpenoids from *Melilotus messanensis*. **Phytochemistry**, v. 49, n.3, p.709-717, 1998.

MARASCHIN-SILVA, F.; AQÜILA, M. E. A. Potencial alelopático de *Dodonaea viscosa* (L.) Jacq. **Iheringia**, Série Botânica, Porto Alegre, v. 60, n. 1, p. 91-98, 2005.

\_\_\_\_\_. Potencial alelopático de espécies nativas na germinação e crescimento inicial de *Lactuca sativa* L. (Asteraceae). **Acta Botânica Brasileira**, v. 20, n. 1, p. 61-69, 2006.

MARTINS E. R.; CASTRO, D. M.; CASTELLANI, D.C; DIAS, J. E. **Plantas Mediciniais**, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 1994. 220 p.

MARTINS, E. R. Estudos em *Ocimum selloi* Benth: isoenzimas, morfologia e óleo essencial. In: \_\_\_\_\_. MING, L.C. **Plantas medicinais, aromáticas e condimentares: avanços na pesquisa agrônômica**. Botucatu: UNESP, 1998. p. 97-126.

MAULIK, G.; BHANDARI, N. M. K. V.; KAGAN, V.E.; PAKRASHI, S.; DAS, D. K. Evaluation of antioxidant effectiveness of a few herbal plants. **Free Radical Research**, v. 27, p. 221-228, 1997.

MGRIEVE, M. A **Modern Herbal**. London: Tiger Books International, 1992. p. 85-86.

MORAES, P. L. R.; DERBYSHIRE, M. T. V. C. Estrutura genética de populações naturais de *Cryptocarya aschersoniana* Mez (Lauraceae) através de marcadores isoenzimáticos. **Biota Neotropica**, v. 2, n. 2, p. 1-19, 2002.

MORAES, L. A. S.; FACANALI, R.; MARQUES, M. O. M. e outros. Phytochemical characterization of essential oil from *Ocimum selloi*. **Anais...** Academia Brasileira de Ciências, v. 74, n. 1, p. 183-186, 2002.

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

NARA, A. K.; WEBBER, A. C. Biologia floral e polinização de *Aechmea beeriana* (Bromeliaceae) em vegetação de baixo na Amazônia Central. **Acta**

**Amazônica**, v. 32, n. 4, p. 571-588, 2002.

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

NIJS, H. C. M. den; MENKEN, S. B. J. Relations between breeding system, ploidy level, and taxonomy in some advanced sections of *Taraxacum*. In: \_\_\_\_\_. **Compositae: Systematics** (H.D.N. Hind & H.J. Beentje, eds.), Royal Botanic Gardens, Kew, 1996. p. 665-677.

NYGREN, A. Apomixis in Angiosperms. Part II. **Botanical Review**, v. 20, p. 577-649, 1954.

OLIVEIRA, P. E. A. M.; GIBBS, P. E.; BARBOSA, A. A.; TALAVERA, S. Contrasting breeding systems in two *Eriotheca* (Bombacaceae) species of the Brazilian cerrados. **Plant Systematics and Evolution**, v. 179, p. 207-219, 1992.

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

OLIVEIRA, A. F.; CARVALHO, D. de; ROSADO, S. C. S. Taxa de cruzamento e sistema reprodutivo de uma população natural de *Copaifera langsdorffii* Desf. na região de Lavras (MG) por meio de isoenzimas. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 25, n. 3, p. 331-338, 2002.

OLIVEIRA, M. do S. P. de; COUTURIER, G.; BESERRA, P. Biologia da polinização da palmeira tucumã (*Astrocaryum vulgare* Mart.) em Belém, Pará, Brasil. **Acta Botanica Brasileira**, v. 17, n. 3, p. 343-353, 2003.

ORMOND, W. T.; PINHEIRO, M. C. B. Contribuição aos estudos bioquímico e ecológico de *Petiveria alliacea*. L. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 34, n. 1, p. 123-142, 1974.

ORR, S. P.; RUDGERS, J. A.; CLAY, K. Invasive plants can inhibit native tree seedlings: testing potential allelopathic mechanisms. **Plant Ecology**, n. 181, p.153-165, 2005.

PARIDA, M. M.; PANDYA, G.; BHARGAVA, R.; JANA, A. M. Assessment of *in vitro* antiviral activity of certain indigenous plants against polio virus type. **Indian Journal of Virology**, v.13, p.101-105, 1997.

PATERNIANI, E. Evolução dos sistemas dos vegetais. **Ciência e Cultura**,

v. 26, n. 5, p. 476-481, 1974.

PAULA, J. P. **Estudo da ação repelente do óleo essencial de *Ocimum selloi* Benth contra o *Anopheles braziliensis* CHAGAS.** 2002. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Curso de Pós-Graduação em Saúde Pública, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa.

PEREIRA, M. C. T.; NIETSCHKE, S.; SANTOS, F. S.; XAVIER, A. A.; CUNHA, L. M. V.; NUNES, C. F.; SANTOS, F. A. Efeito horários de polinização artificial no pegamento e qualidade de frutos de pinha (*Annona squamosa* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 25, n. 2, p. 203-205, 2003.

PERIOTTO, F.; PEREZ, S. C. J. G. A.; LIMA, M. I. S. Efeito alelopático de *Andira humilis* Mart. ex Benth na germinação e no crescimento de *Lactuca sativa* L. e *Raphanus sativus*. L. **Acta botânica brasílica**, v.18, n. 3, p. 425-430. 2004.

PINO, J. A.; ROSADA, A.; RODRIGUEZ, M.; GARCIA, D. Composition of the essential oils of *Ocimum tenuiflorum* grown in Cuba. **The Journal of Essential Oil Research**, v. 10, p. 437-438, 1998.

PIO, L. A. S.; RAMOS, J. D.; PASQUAL, M.; SANTOS, F. C.; JUNQUEIRA, K. P. Receptiveness of the stigma and *in vitro* germination of orange pollen, submitted to different temperatures. **Ciência Agrotécnica**, v. 28, n. 5, p. 1087-1091, 2004.

PIRES, N. M.; SOUZA, I. R. P.; PRATES, H. T.; FARIA, T. C. L.; FILHO, I. A. P.; MAGALHÃES, P. C. Efeito do extrato aquoso de leucena sobre o desenvolvimento, índice mitótico e atividade da peroxidase em plântulas de milho. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.13, n.1, p. 55-65, 2001.

PRASHAR, R.; KUMAR, A.; BANERJEE, S.; RAO, A.R. Chemo preventive action by an extract from *Ocimum sanctum* on mouses skin papillomagenesis and its enhancement of skin glutathione S - transferase activity and acid soluble sulfydryl level. **Anti Cancer Drugs**, v. 5, p. 567-572, 1994.

RAJU, P. M.; ALI, M.; VELASCO - NEGUERUELA, A.; PEREZ ALONSON, M. J. Volatile constituents of the leaves of *Ocimum sanctum*. **The Journal of Essential Oil Research**, v. 11, p. 159-161, 1999.

RAM, D. Fungitoxicity of some plant extract against *Alternaria brassicae*.

**Annals of Agricultural and Biology Research**, v. 2, p. 25-26, 1997.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. E.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. São Paulo: Guanaba-Koogan, 2001. 906p.

RENNER, S. S. A survey of reproductive biology in Neotropical Melastomataceae and Memecylaceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 76, p. 496-518, 1989.

RIBEIRO, G. S. **Aspectos da biologia floral relacionados à produção de sementes e frutos de pinha (*Annona squamosa* L.)**. 2006. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Curso de Pós graduação em Agronomia - Área: Fitotecnia, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Vitória da Conquista.

RIBEIRO JÚNIOR, J. I. **Análises estatísticas no SAEG**. Viçosa: UFV, 2001. 301p.

RICHARDS, A. J. **Plant breeding systems**. Londres: Chapman & Hall, 1997.

RODRIGUES, F. C. M. P.; LOPES, B. M.; Potencial Alelopático de *Mimosa caesalpinaefolia* Benth sobre sementes de *Tabebuia Alba* (Cham.) Sandw. **Floresta e Ambiente**, Rio de Janeiro. v. 8, n. 1, p.130-136, 2001.

SAITO, M. L.; LUCHINI, F. **Substâncias obtidas de plantas e a procura por praguicidas eficientes e seguros ao meio ambiente**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, 1998.

SAMMBAMURTY, A. V. S. S.; N. S. SUBRAHMANYAN. **Medicinal Plants in Industry**. New Delhi: C.B.S. Publishers, 2000. p. 48-49.

SANTOS, J. C. F.; SOUZA, I. F.; MENDES, A. N. G.; MORAIS, A. R.; CONCEIÇÃO, H. E. O.; MARINHO, J. T. S. Efeito de extratos de cascas de café e de arroz na emergência e no crescimento do caruru-de-mancha. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v. 37, n. 6, p. 783-790, 2002.

SCHERER, L. M.; ZUCARELI, V.; ZUCARELI, C. A.; FORTES, A. M. T. Alelopathic effect of aqueous extracts of leucena (*Leucaena leucocephala* Wit) leave and fruit on germination and root growth of canafistula (*Peltophorum dubium* Spreng). **Semina**, Londrina, v. 26, n. 2, p. 161-166, 2005.

SILVA, F.; CASALI, V. W. D. **Plantas medicinais e aromáticas: pós-colheita e óleos essenciais**. 2. ed. Viçosa, MG: UFV, Departamento de Fitotecnia, 2000. 153p.

SILVA, I. V.; KANASHIRO, M.; MAUÉS M. M. Aspecto da Biologia de Parapará (Jacaranda copaia Aubl. D. Don. Bignoniaceae). In: \_\_\_\_\_. CONGRESSO NACIONAL De BOTÂNICA, 54., Belém, PA. **Resumos**, 2003.

SILVA, A. H. B.; ALMEIDA, O. S.; ROCHA, A. N.; BRITO, A. C.; SILVA, A. B.; PEREIRA, D. A.; ALVES, J. S.; FERNANDES, J. H. F.; CABRAL, S. N.; SILVA, A. B.; AMARAL, C. L. F. Relação pólen/óvulo como método de estimar o sistema reprodutivo em *Ocimum basilicum*. In: \_\_\_\_\_. SEMANA DO MEIO AMBIENTE E III SEMANA DO BIÓLOGO, 4., Vitória da Conquista. **Anais...** 2005.

SILVA, C. B.; SILVA, C. B.; VIEIRA, M. C. Pollination of alfavacão (*Ocimum gratissimum*) - L.(Lamiaceae), of the reproductive mechanisms. **Journal of the Brazilian Association for Horticultural Science**, v.24, n.1, p.2872-2875, 2006.

SILVA, L. M. M.; AGUIAR, I. B.; VIÉGAS, R. A.; MENDONÇA, I. F. C. Biologia Reprodutiva de *Cnidoscylus juercifolius* Pax & K. Hoffm (Euphorbiaceae). **Revista de biologia e ciências da terra**, v. 6, n.2, 2006.

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.

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 and J.E. Simon (eds.)**, Alexandria: ASHS Press, 1999.

SINGH, S.; MAJUNDAR, D. K. Evaluation of antiinflammatory activity of fatty acids of *Ocimum sanctum* fixed oil. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 35, n. 4, p. 380–383, 1997.

SOARES, G. L. G.; SCALON, V. R.; PEREIRA, T. O.; VIEIRA, D. A. Potencial alelopático do extrato aquoso de folhas de algumas leguminosas arbóreas brasileiras. **Floresta e Ambiente**, v. 9, n.1, p.119-126, 2002.

SOBTI, S.; PUSHPANGADAN, P. Studies in the genus *Ocimum*: cytogenetics, breeding and production of new strains of economic importance. In: **Cultivation and Utilization of Aromatic Plants**. Kapur: C. K. Atal and B. M., 1982. p. 457-472.

SOUZA M. M.; PEREIRA, T. N. S.; MARTINS, E. R. Microesporogênese e

Microgametogênese associadas ao tamanho do botão floral e da antera e viabilidade polínica em Maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener). **Ciência Agrotécnica**, v. 26, n. 6, p. 1209-1217, 2002.

SOUZA, L. S.; VELINI, E. D.; MAIOMONI-RODELLA, R. C. S. Efeito alelopático de plantas daninhas e concentrações de capim-braquiária (*Brachiaria decumbens*) no desenvolvimento inicial de eucalipto (*Eucalyptus grandis*). **Planta Daninha**, Viçosa-MG, v.21, n.3, p.343-354, 2003.

SOUZA, D. A. S.; LENZI, M.; ORTH, A. I. Contribuição à ecologia da polinização de *Tabebuia pulcherrima* (Bignoniaceae) em área de restinga, no sul de Santa Catarina. **Biotemas**, v.17, n. 2, 2004.

SOUZA, S. A. M. **Biotestes na Avaliação da Fitotoxicidade de Extratos Aquosos de Plantas Medicinais Nativas do Rio Grande do Sul**. Universidade Federal de Pelotas, RS:UFPel, 2005. 89p. Monografia (Graduação em Biologia) - Universidade Federal de Pelotas.

SOUZA, T. S. **Avaliação do potencial genotóxico e mutagênico do Rio Paraíba do Sul, numa área sob influência de uma refinaria de petróleo, utilizando *oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae) como organismo-teste**. 2005 Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Curso de Pós - Graduação em Ciências Biológicas - Área: Biologia Celular e Molecular, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro.

SOUZA FILHO, A. P. S. e outros. Potencial alelopático de forrageiras tropicais: efeitos sobre invasoras de pastagens. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 15, n. 1, p. 53-60, 1997.

SOUZA FILHO, A.P.S.; PEREIRA, A.A.G.; BAYMA, J.C. Allelochemical Produced by the Forage Grass *Brachiaria humidicola*. **Planta Daninha**, Viçosa-MG, v. 23, n. 1, p. 25-32, 2005.

SPILLANE, C.; VIELLE-CALZADA, J. P.; GROSSNIKLAUS, U. APO2001: A sexy apomixier in *Como*. **Plant Cell**, v. 13, p.1480-1491, 2001.

STÖSSER, R.; HARTMAN, W.; ANVARY, S. F. General aspects of pollination and fertilization of pome and stone fruit. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 423, 1997.

TECHIO, V. H.; DAVIDE, L. C.; PEDROZO, C. Â.; PEREIRA, A. V. Viabilidade do grão de pólen de acessos de capim-elefante, milheto e híbridos



interespecíficos (capim-elefante x milho). **Acta Scientiarum Biological Science**, Maringá, v. 28, n. 1, p. 7-12, 2006.

TOKURA, L. K.; NÓBREGA, L. H. P. Alelopatia de cultivos de cobertura vegetal sobre plantas infestantes. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 28, n. 3, p. 379-384, 2006.

TOMITA-YOKOTANI, K.; KATO, T.; HASHIMOTO, H.; YAMASHITA, M. Response of allelochemicals under pseudo-microgravity in sunflower plant (*Helianthus annuus* L. cv. Taiyo). **Biological Sciences in Space**, v. 19, n. 3, p. 143-147, 2005.

TORREY, T. Breeding herbs of culinary and ornamental use. In: **Natural. Herb Growing and Marketing Conference**. San Jose: Proceedings Buehrle, 1989. p. 38-40.

VANISAREE, A. J.; DEVAKI, T. Biochemical studies evaluating the antiulcerogenic potential of *Ocimum sanctum* in experimentally induced peptic ulcers in rats. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 19, p. 79-87, 1995.

VIDAL, W. N.; VIDAL, M. R. R. **Botânica - organografia; quadros sinóticos ilustrados de fanerógamos**. 4.ed. rev. ampl. Viçosa: UFV, 2000. 124p.

VIEIRA, R. D.; CARVALHO, N. M. **Testes de vigor de sementes**. São Paulo: Funep, 1994. 164p.

VIELLE-CALZADA, J. P., CRANE, C. F.; STELLY, D. M. Apomixis - The asexual revolution. **Science**, v. 274, p. 322-323, 1996.

XUAN, T. D.; TAWATA, S.; KHANH, T. D.; CHUNG, I.M. Decomposition of allelopathic plants in soil. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 191, p. 162-171, 2005.

ZAYAS, J. C. **Las frutas anonáceas**. Havana, La Habana, 1996. 61 p.

WALLER, G. R.; JURZYSTA, M.; THORNE, R. L. A. Allelopathic activity of root saponins from alfalfa (*Medicago sativa* L.) on weeds and wheat. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, Taipei, v. 34, p. 1-11, 1993.

WARDLE, D. A.; NILSSON, M. C.; GALLET, C.; ZACKRISSON, O. An ecosystem-level perspective of allelopathy. **Biological Reviews**, v. 73,

p. 305-319, 1998.

WATSON, L.; DALLWITZ, M. J. **The Families of Flowering Plants**. 1999.

WENDT, S. N. **Genética de Populações em *Ilex paraguariensis* St. Hil.** 2005. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) - Curso de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos - Área de concentração em Agroindústria, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

YAMAHARA, K. J. Antidepressive and anticonvulsant activity of *Ocimum sanctum*. **Journal Ethnopharmacol**, v. 22, p.75-79, 1988.