

## Obtención de aceites esenciales de albahaca (*Ocimum basilicum* L.) a partir de tejidos cultivados *in vivo* e *in vitro*

Marilú Chirinos<sup>1\*</sup>, Rosalía Velásquez<sup>2</sup>, Carlos Ascanio<sup>2</sup>, Jonás Mata<sup>2</sup> y Armando Carrasqueño<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Botánica. Universidad Centro Occidental Lisandro Alvarado. Apdo. 400. Barquisimeto. Lara. Venezuela

<sup>2</sup>Instituto de Genética. Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela. Apto. 4579. Maracay 2101. Aragua. Venezuela

<sup>3</sup>Departamento de Química, Universidad Pedagógica Experimental Libertador "Rafael Escobar Lara". Maracay, Aragua. Venezuela

### RESUMEN

Con el fin de obtener aceites esenciales en dos genotipos de albahaca, *Ocimum basilicum* var. *basilicum* (blanca) y var. *purpurascens* (morada), se procedió a la extracción de aceite a través de las técnicas de destilación por arrastre y solvente orgánico para callos cultivados *in vitro* y material vegetal *in vivo*. Adicionalmente, se evaluó la capacidad antibiótica de los aceites esenciales obtenidos. Para la inducción de callos se utilizaron explantes de hojas en expansión e inflorescencias inmaduras, las cuales se cultivaron en medio MS con 2 y 4 mg/L de Tildiazuron (TDZ). El fenotipo blanco produjo mayor número de callos en el medio con 4 mg/L de TDZ, mientras que para la variedad morada no se observaron diferencias en ambas concentraciones de TDZ. Se observaron estructuras secretoras mediante microscopía óptica y electrónica de barrido. Las secciones *in vivo* mostraron una epidermis con sólo una capa de células, tricomas no glandulares y glandulares del tipo capitado y peltado. Los tricomas peltados presentaron una célula apical central dividida en 4 células. En el cáliz se encontraron tricomas peltados distendidos y un gran número de no glandulares. En los callos se observaron tejidos epidérmicos colapsados, células con lípidos en la membrana celular y citoplasma. El aceite extraído presentó aspecto transparente, de color ligeramente amarillo y de olor aromático característico. La espectrofotometría infrarroja demostró similar composición química de los aceites esenciales obtenidos *in vitro* e *in vivo*, resultando dependiente del genotipo el efecto antibiótico de los aceites esenciales sobre *Escherichia coli* del tipo gram negativo.

**Palabras clave:** aceites, albahaca, anatomía, *in vitro*, *in vivo*

### Obtention of basil (*Ocimum basilicum* L.) essential oils from *in vivo* and *in vitro* cultured tissue

### ABSTRACT

To obtain essential oils in two genotypes of basil *Ocimum basilicum* var. *basilicum* (white) and var. *purpurascens* (purple), distillation dragging and organic solvent were the methods used oil for extraction for *in vitro* callus and *in vivo* material. In addition, the antibiotic capacity of the essential oils was evaluated. Expanded leaves and immature inflorescences were used as explants for callus induction. They were cultivated in MS media supplemented with two different concentrations of Thidiazuron (TDZ), 2 and 4 mg/L. The white phenotype produced higher number of callus in the media containing 4 mg/L TDZ, no statistical difference was observed for the purple variety. Secretory glands were observed by optical microscopy and electronic scan microscopy. *In vivo* tissue showed one layer of cells in epidermis, glandular and not glandular trichomes and capitate and peltate types were observed. The peltate trichomes had apical cells divided in four cells. In the calyx, distended peltate trichomes and great number of not glandular trichomes were observed. Collapsed epidermal cells and oil cells were observed in callus tissue specifically in cell membrane and cytoplasm. The oil was of transparent aspect,

---

\*Autor de correspondencia: Marilú Chirinos

E-mail: mchirinos@gmail.com

Recibido: febrero 10, 2009

Aceptado: junio 18, 2009

light yellow color, and characteristic aromatic odor. Similar chemical composition of the essential oils from callus and *in vivo* tissue were found by infrared spectrum. The antibiotic capacity of the essential oils on gram negative *Escherichia coli* showed that this oil capacity was genotype dependant.

**Key words:** anatomy, basil, oil, *in vitro*, *in vivo*.

## INTRODUCCIÓN

*Ocimum basilicum* L. es un cultivo de importancia económica global, con una producción mundial anual de 100 t de aceites esenciales (Fundación Exportar, 2006), sintetizados y almacenados en tricomas glandulares especializados, ubicados en diversos órganos de la planta (flores, hojas, brotes, tallos y semillas) con una calidad que depende de factores externos (climáticos y agronómicos) e internos del cultivo (variedad, edad de la planta y órgano utilizado) (Werker *et al.*, 1993).

Este cultivo se propaga convencionalmente a través de semillas (Begun *et al.*, 2000; Mandal *et al.*, 2000). Sin embargo, la micropropagación *in vitro* es un método eficaz para la multiplicación rápida de esta especie aromática, donde la regeneración ha sido exitosa, utilizando para ello diferentes tipos de explantes, tales como: segmentos nodales, discos de hojas, hojas cotiledonales, inflorescencias y brotes axilares (Pattnaik y Chand, 1996; Phippen y Simon, 2000; Begum, 2000, 2002). Son pocos los trabajos señalados sobre la aplicación del cultivo de tejidos vegetales *in vitro* para la producción de aceites esenciales, lo que hace pensar en la posibilidad de producción comercial de éstos los cuales son biosintetizados en muchas especies vegetales, convirtiendo esta estrategia biotecnológica en la mejor herramienta de uso de la megadiversidad de los recursos vegetales (Robert *et al.*, 1993; Zapata, 1995; Sahoo *et al.*, 1997).

Con el presente trabajo se planteó obtener un método eficiente de extracción de aceites esenciales a partir de hojas e inflorescencias de plantas cultivadas *in vivo* y de callos obtenidos *in vitro* de dos variedades de albahaca (*O. basilicum* L.), así como también evaluar el efecto antibiótico que presenta este aceite esencial.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se llevó a cabo en los Laboratorios de Cultivo de Tejidos del Centro de Investigaciones en Biotecnología Agrícola de la Facultad de Agronomía (FAGRO) de la Universidad Central de Venezuela, Centro de Microscopía Electrónica de las Facultades de Veterinaria y Agronomía de esta Universidad y Laboratorio de Investigación en Química Aplicada de la Universidad Pedagógica Experimental Libertador "Rafael Escobar Lara", Maracay.

Como material vegetal se utilizaron plantas de albahaca en estado de floración, cultivadas en el campo experimental del Instituto de Genética de FAGRO seleccionando los genotipos: *O. basilicum* L. var *basilicum* (genotipo blanco) y var. *purpurascens* (genotipo morado). Para los ensayos *in vitro* se utilizaron explantes florales (botones inmaduros) y hojas jóvenes en expansión.

El material seleccionado se desinfectó en una solución jabonosa por 10 min, luego se sumergió en etanol al 70% por un min y finalmente en una solución de cloro comercial al 20% por 7 min con agitación constante, eliminando el exceso de cloro con agua destilada estéril.

### Inducción de callos

En el caso de los explantes de hojas se utilizó la lámina media, cortando secciones de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> con parte de la nervadura principal. En las inflorescencias se cortó la parte apical y basal dejando sólo la sección intermedia de los botones. Se utilizó el medio de Murashige y Skoog (1962) y se evaluaron dos concentraciones (2 y 4 mg/L) de Tiazuron (TDZ), comparándolo contra un tratamiento testigo sin regulador.

Se utilizó un diseño completamente aleatorizado con arreglo factorial 3 x 2 x 2 (tres concentraciones, dos genotipos y dos explantes). Los datos se analizaron con la prueba de comparación de medias de Duncan (Anderson and Sweeney, 2008), realizándose evaluaciones para el número de callos formados por explante.

### Estudios anatómicos

La observación anatómica de las estructuras o tricomas glandulares secretores de aceites esenciales en material *in vivo* e *in vitro* se realizó utilizando la microscopía óptica y electrónica. Se seleccionaron callos de aproximadamente 40 d de cultivo, para los dos tipos de explantes. Se fijaron en una solución de FAA 70 (70% formol, 15% ácido acético y 15% alcohol) y se deshidrataron con una serie ascendente de alcohol. Finalmente, se colocaron en parafina y se realizaron los cortes con ayuda de un micrótopo.

Los cortes del material vegetal *in vivo* se realizaron a mano alzada sumergiendo los tejidos de hojas y flores en una solución de agua:glicerina (1:1), colocados previamente en el portaobjeto, para ser teñidos con una solución de Sudan IV saturada en etanol al 70%, detectando los lípidos al teñirse de color naranja.

Para los estudios de microscopía electrónica de barrido se utilizaron secciones foliares y de inflorescencia de material vegetal fresco y callos organogénicos. Las muestras se fijaron en una solución de glutaraldehído al 2% en tampón fosfato 0,1M pH 7,2 a 4°C, durante 4 h, posteriormente se fijaron en tetróxido de osmio ( $O_8O_4$ ) 2% durante 2 h y se deshidrataron en una serie de solución ascendente de alcohol. Siguiendo la metodología del Centro de Microscopía Electrónica de la Facultad de Agronomía, el material fue secado por punto crítico y metalizado en oro. Las observaciones y las microfotografías se hicieron en un microscopio electrónico de barrido marca Phillips®, modelo XL20.

### Extracción de aceites esenciales

Se recolectaron inflorescencias y hojas apicales frescas del campo, las cuales fueron secadas a temperatura ambiente, se pesaron y se molieron para incrementar la superficie de contacto. El proceso de extracción de los aceites fue por el método de destilación a vapor de agua, con una duración aproximada de 4 a 6 h. El extracto obtenido fue en forma de hidrolato (mezcla de agua y aceites esenciales) y la separación de la fase acuosa se realizó utilizando cloroformo, el precipitado fue extraído y una vez evaporado el solvente, el aceite obtenido fue almacenado bajo refrigeración a 6°C. Para callos se utilizó cloroformo como solvente orgánico en el proceso de extracción, utilizando aproximadamente 20 callos por envase, los cuales fueron macerados con el solvente y almacenados por 7 d a temperatura ambiente en una cámara extractora de gases. El extracto fue filtrado a través de un rotovapor a 75°C (punto de ebullición del cloroformo) para la separación del solvente.

A los extractos obtenidos se les realizó pruebas organolépticas (aspecto, color y olor) y de espectroscopia de infrarrojo, esta última con un equipo Perkin Elmer® RX1 STIR Espectronic. Adicionalmente a la variedad *O. basilicum* var. *purpurascens* se le detectó la presencia de pigmentos antocianinas con la ayuda del espectrofotómetro de absorción de luz visible Agilent® 8353 UV.

### Efecto antibiótico de los aceites esenciales

Se determinó por el método de incorporación en placa de cultivo y por difusión en agar. Las evaluaciones se realizaron en la cepa bacteriana de *Escherichia coli* DHSa. El medio de cultivo empleado para multiplicación de la cepa bacteriana fue el LB (Triptona 10 g/L + extracto de levadura 5 g/L + cloruro de sodio 5 g/L, pH 7,3) y caldo nutritivo (8 g/L, pH 6,8). La turbidez del inóculo utilizado fue semejante al tubo No 2 ( $2 \times 10^8$  UFC) de la escala MacFarland.

Las disoluciones de los aceites esenciales obtenidos se realizaron con etanol 96% para obtener una misma concentración de trabajo. Discos de 0,5 cm de diámetro

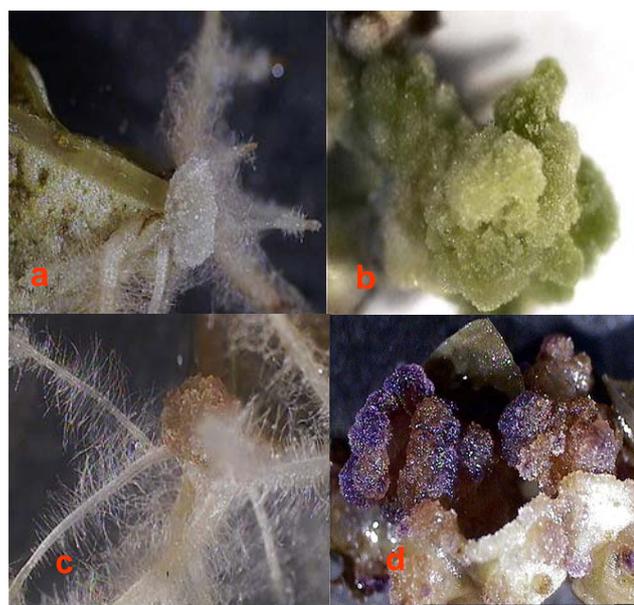
de papel de filtro Whatman N°1 se embebieron en los aceites esenciales y se colocaron en el centro de las capsulas, realizándose seis repeticiones por genotipo evaluado. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 h. Transcurrido el período, se observó la formación de zonas de inhibición, procediendo a registrar los diámetros (cm) en la medición de halos. Los resultados se analizaron con la prueba estadística de comparación de medias de Kruskal y Wallis (Anderson y Sweeney, 2008), ya que no se cumplieron los supuestos de normalidad.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Inducción de callos

La mayor formación de callos se observó para los explantes provenientes de *O. basilicum* var *basilicum* implantados en el medio con 4 mg/L TDZ. Estos callos presentaron apariencia embriogénica, friables y de color verde claro una vez transferidos al cuarto de crecimiento con luz natural. Los tratamientos testigo y 2 mg/L TDZ presentaron poca respuesta callogénica, encontrándose que la formación de callos ocurría específicamente en la zona cercana a la nervadura central; sin embargo, se observó organogénesis de raíces (Figuras 1a,b,c).

Para el genotipo *O. basilicum* var *purpurascens*, la respuesta a los tratamientos fue similar entre ellos, no encontrándose diferencias estadísticamente significativa al 5%. La respuesta del explante no se vio afectada por la composición del medio de cultivo, lo que sugiere que esta especie contiene



**Figura 1.** a. Formación de callos y respuesta organogénica (raíces) en los explantes de *O. basilicum* var *basilicum*, b. Callo embriogénico, c. Callos y organogénesis del explante *O. basilicum* var *purpurascens*, d. Callos embriogénicos con expresión de pigmentos antocianinas

citocininas y auxinas endógenas en cantidad suficiente para generar callos con apariencia embriogénica, observándose además presencia de antocianinas en la Figura 1d (Pattnaik y Chand, 1996; Begum *et al.*, 2000).

En el explante flor, del genotipo blanco cultivado *in vitro*, se observó la proliferación de células en forma desordenada dando inicio a la producción del callo en la superficie del cáliz para los tratamientos con 2 y 4 mg/L TDZ. No se observaron diferencias significativas en los valores promedio de callos formados en botones florales inmaduros indicando que hay inducción y crecimiento celular por acción del TDZ. La especie *O. basilicum* var *basilicum* produjo mayor número de callos en los explantes de hoja para tratamiento con 4 mg/L TDZ que el genotipo *O. basilicum* var *purpurascens*. Para el resto de los tratamientos no se encontraron diferencias estadísticas significativas.

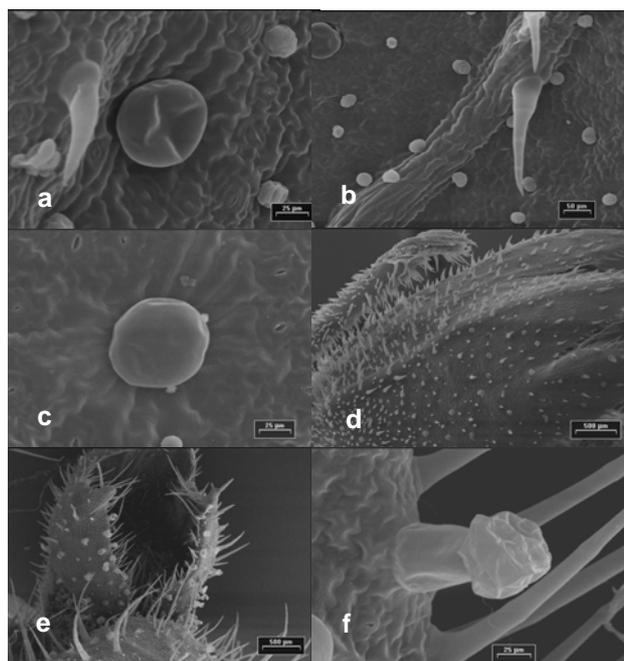
### Observaciones anatómicas y ultraestructurales

Las características anatómicas y ultraestructurales del material *in vivo* para ambos genotipos son muy similares, coincidiendo que los órganos utilizados contienen tricomas glandulares y no glandulares en la superficie. Los estudios anatómicos indican que la epidermis en hojas está compuesta por una sola capa de células, cubierta por una fina cutícula con tricomas glandulares del tipo capitado y peltado, los cuales están presentes en ambas caras.

En estudios ultraestructurales, los tricomas no glandulares unicelulares y multicelulares predominaron en la cara abaxial de las hojas, específicamente sobre la nervadura central y secundaria (Figura 2a, b, c). Los tricomas no glandulares de la cubierta del cáliz en ambos genotipos son numerosos y su estructura es similar a los de las hojas (Figuras 2d,e). Las glándulas peltadas están extendidas desde la base y se encuentran sobre los canales de las nervaduras, siendo específico para este órgano (Figura 2f).

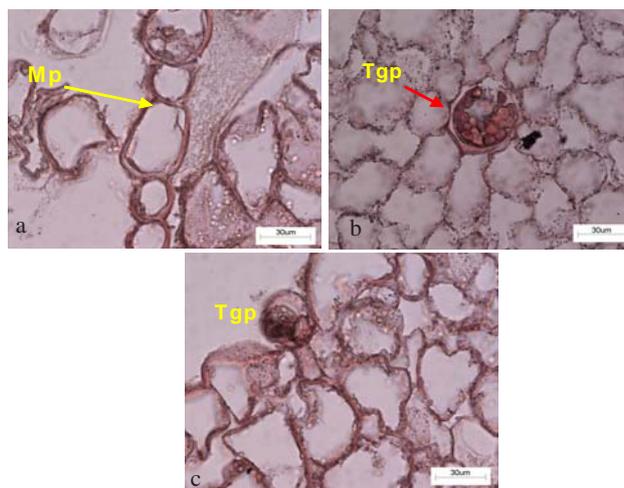
Para el material cultivado *in vitro*, en general se observaron células organizadas en las zonas internas de los callos, mostrando una activa división. Los callos formados fueron de origen epidérmico y subepidérmico. Los callos de inflorescencias fueron muy semejantes a los obtenidos en las hojas. Se detectaron porciones lipídicas en áreas adyacentes a las células y citoplasmas, las cuales se tiñeron de color rojoraranja con el colorante (Figura 3a).

En algunas células que posiblemente eran epidérmicas, se encontraron depósitos de aceites intactos durante el proceso de dediferenciación celular. Las características histológicas indicaron que eran de actividad secretora y quizás el engrosamiento de la pared y la suberización en la fase secretora y postsecretora de las células basales y del pedúnculo del tricoma no permitió la división mitótica (Figuras 3b, c).



**Figura 2.** Imágenes captadas a partir del microscopio electrónico de barrido **a.** Cara adaxial de la hoja (200X), **b.** Tricomas no glandulares en nervaduras secundarias en cara abaxial de la hoja y tricomas capitados (200X), **c.** Detalle de tricoma peltado con división central (500X), **d.** Presencia de tricomas no glandulares unicelular y multicelulares en pedúnculo floral (50X), **e.** Vista frontal de la superficie del cáliz con presencia de tricomas glandulares y no glandulares, **f.** Tricoma glándular peltado extendido desde la base (500X)

A través de las observaciones al microscopio electrónico de barrido se pudo inferir que el origen interno de los callos ocurrió a partir de tejidos del *cambium*, cercano a los haces vasculares del mesófilo de la hoja y del cáliz de la flor, ocasionando la ruptura de los tejidos epidérmicos a medida



**Figura 3.** **a.** Células meristemáticas con contenido de lípido en la membrana plasmática (20X), **b.** Tricoma peltado compuesto por células secretoras, dispuestas en dos círculos concéntricos y engrosamiento de la pared celular (20X), **c.** Tricoma glándular peltado intacto en resto de tejido epidérmico (20X)

que las células se dividían. En los restos de epidermis se observó que las células especializadas que forman tricomas no glandulares y las glándulas secretoras colapsaron internamente, quizás por los tipos de alcoholes utilizados en el procesamiento de deshidratación de las muestras, ya que los aceites son solubles en estos compuestos.

### Extracción de aceites esenciales

Las características organolépticas indicaron que el aceite extraído era de aspecto transparente, de color ligeramente amarillo y de olor aromático característico. El rendimiento relativo al peso seco de las muestras de hojas y flores y la cantidad en relación al extracto fue mayor ( $p < 0,05$ ) en las flores de la variedad *O. basilicum* var *purpurascens*. El rendimiento en *O. basilicum* var *basilicum* de hojas y flores fue muy semejante (Cuadro 1).

En los callos no fue posible obtener una cantidad de extracto suficiente para calcular rendimiento, siendo lo obtenido utilizado en la prueba de espectrofotometría infrarroja y luz visible. Esto demuestra las razones por las cuales la técnica de cultivo de tejidos ha tenido poca aplicación en la síntesis de compuestos terpenicos en albahaca para la obtención de aceites esenciales; sin embargo, esta técnica ha sido exitosa en la obtención de otros metabolitos secundarios (Robert *et al.*, 1993).

### Espectrofotometría infrarroja

Se observó que los constituyentes de los aceites obtenidos a partir del material de campo y los obtenidos *in vitro* de flores moradas y blancas, y de hojas moradas son similares (Figuras 4a,b,c,d). En los callos de las hojas blancas no fue posible la determinación.

El espectro del solvente cloroformo se comparó con los otros espectros para sustraer la presencia de picos comunes con la muestra original, con la cual se observó las vibraciones de los grupos funcionales y enlaces presentes en el extracto final de los callos obtenidos en ambos genotipos (Figura

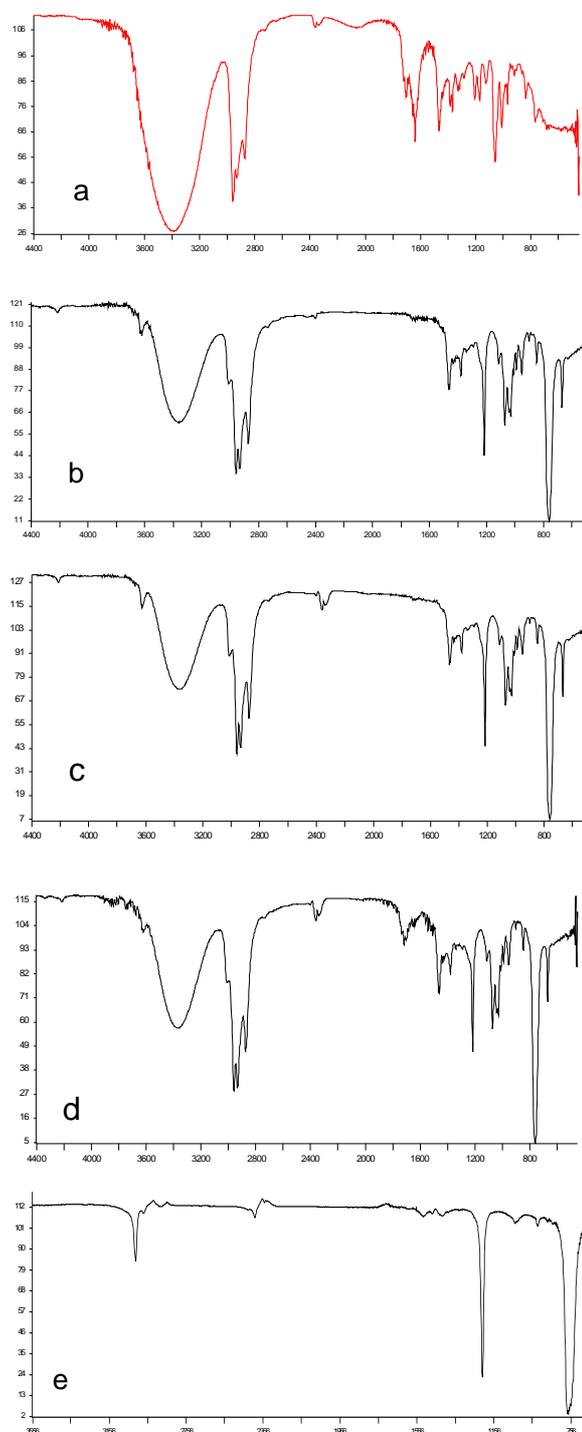
**Cuadro 1.** Rendimiento de los aceites esenciales para los diferentes órganos y genotipos de albahaca *in vivo*.

Genotipo <sup>1</sup>	Peso de la muestra (g)	Cantidad de aceite (mg/mL etanol) <sup>2</sup>	Rendimiento (%)
Hoja blanca	85,0	138,3	0,16b
Hoja morada	98,0	15,9	0,01c
Flor blanca	100,9	202,7	0,20b
Flor morada	99,9	356,6	0,36a

<sup>1</sup>Genotipos: *O. basilicum* L. var *basilicum* (genotipo blanco) y *O. basilicum* var. *purpurascens* (genotipo morado).

<sup>2</sup>mg de aceite extraído por ml de etanol ( $p < 0,05$ ).

4e). A partir de esta prueba se puede inferir que ocurrió la síntesis de aceites esenciales, ya que ha sido posible aislarlos e identificarlos en otras especies aromáticas (Bais *et al.*, 2006; Figueiredo *et al.*, 1995)



**Figura 4.** Curvas del espectro infrarrojo. **a.** Extracto de aceites en hojas blancas, material *in vivo*, **b.** Extractos en callos de hojas moradas, **c.** Extractos en callos flores blancas, **d.** Espectro de los extractos en callos flores moradas, **e.** Espectro del solvente cloroformo

## Efecto antibiótico de los aceites esenciales

Para la variable diámetro de inhibición se detectaron diferencias estadísticamente significativas al 5% cuando fueron comparados los cuatro tratamientos (Cuadro 2). No todos los tratamientos utilizados generaron el mismo efecto sobre la bacteria *E. coli*, resultando más efectivo el aceite extraído de las hojas moradas, a pesar de su bajo rendimiento, ya que el halo de inhibición observado fue 6 mm, aproximadamente. El etanol 96% no tuvo efecto inhibitorio sobre la bacteria. Estos resultados confirman el efecto antimicrobiano que poseen los aceites esenciales de albahaca sobre las bacterias *E. coli* del tipo gram negativo.

**Cuadro 2.** Valores promedios generados para cada uno de los tratamientos empleados en el control de *E. coli*.

Tratamiento	Diámetro (cm <sup>2</sup> )
Etanol 96%	0,00c
Hoja morada	0,61a
Flor blanca	0,36b
Flor morada	0,16b

Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0,5$ ).

## CONCLUSIONES

El mejor tratamiento para la inducción y mayor número de callos por explantes hojas y flores blancas resultó el de 4 mg/L TDZ, no encontrándose diferencias para la variedad morada. En el tratamiento sin reguladores de crecimiento se observó para ambos genotipos, la formación de raíces, lo que sugiere que hubo alto contenido endógeno de auxina. En las muestras de hojas y flores de las plantas de campo, los estudios anatómicos y ultraestructurales permitieron observar gran cantidad de tricomas glandulares y no glandulares en la epidermis. Los tricomas no glandulares del cáliz en las inflorescencias fueron numerosos y las glándulas peltadas se presentaron extendidas en la base, estos últimos presentándose sólo en este órgano. Las curvas obtenidas por espectrofotometría infrarroja indicaron que en los extractos provenientes de los callos *in vitro* de hoja morada, flor blanca y flor morada, y en las hojas blancas procedentes del material de campo, existen compuestos químicos con estructuras moleculares similares, algunos de los cuales podrían estar asociados a la síntesis de aceites esenciales. El efecto de la actividad antibiótica de los aceites esenciales sobre la bacteria *E. coli* fue dependiente del genotipo, resultando mejor la especie *O. basilicum* var *basilicum*.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anderson, D.; D. Sweeney. 2008. Estadística para administradores y economistas. Cengage Learning Editores. New York. EUA.
- Bais, P.; B. Dattatreya; G.A. Ravishankar. 2003. Production of volatile compounds by hairy root cultures of *Cichorium intybus* L. under the influence of fungal elicitors and their analysis using solid-phase micro extraction gas chromatography-mass spectrometry. *J. Sci. Food Agri.* 83: 769-774.
- Begum, F.; M. Amin; A. Mak. 2000. *In vitro* clonal propagation of Holy Basil *Ocimum sanctum* L. *Plant Tissue Cult.* 10: 31 - 37.
- Begum, F.; M. Amin; A. Mak. 2002. *In vitro* rapid clonal propagation of *Ocimum basilicum*. *Plant Tissue Cult.* 12: 27-35.
- Figueiredo, C.; M. Salomé; S. Pais; J. Scheffer. 1995. Composition of the essential oil from cell suspension cultures of *Achillea millefolium* ssp. *Millefolium*. *Plant Cell. Tiss. Org. Cult.* 40: 113-118. Disponible en: <http://www.springerlink.com/content/m58n58n77823w80w/?p=4cd503c2d24844afbca4ed5a04323066&pi=6> [Consultado: 12 mayo 2006].
- Fundación Exportar. 2006. Informe mensual: Análisis de la tendencia internacional del mercado internacional de los aceites esenciales Argentina. Disponible en: <http://www.exportar.org.ar/exportar/modules.html>. [Consultado: 16 Octubre 2006].
- Mandal, J.; S. Pattnaik; P.K. Chand. 2000. Alginate encapsulation of axillary buds of *Ocimum americanum* L. (Hoary Basil), *O. basilicum* L. (Sweet Basil), *O. gratissimum* L. (Shrubby Basil), and *O. sanctum* L. (Sacred Basil). *In vitro Cell. Devel. Biol. Plant* 36: 287-292.
- Murashige, T.; F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant* 15: 473-497
- Pattnaik, S.; P. Chand. 1996. *In vitro* propagation of the medicinal herbs *Ocimum americanum* L. syn. *O. canum* Sims. (hoary basil) and *Ocimum sanctum* L. (holy basil). *Plant Cell.* 15: 846-850.
- Phippen, W.; J. Simon. 2000. Shoot regeneration of young leaf explants from basil (*Ocimum basilicum* L.). *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 36: 250-254.
- Robert, M.L.; J. Reyes; M. Loyola. 1993. Biosíntesis y bioconversión de metabolitos secundarios. Disponible en: <http://www.ciat.cgiar.org/biotechnology/contenido.html>. [Consultado: 15 Mayo 2007]
- Sahoo, Y.; S. Pattnaik; P. Chand. 1997. *In vitro* clonal propagation of an aromatic medicinal herb *Ocimum basilicum* L. (sweet basil) by axillary shoots proliferation. *In vitro Cell. Devel. Biol. Plant* 33: 293-296.
- Werker, E.; E. Putievsky; U. Ravid. 1993. Glandular hairs and essential oil developing leaves of *Ocimum basilicum* (Lamiaceae). *Ann. Bot.* 71: 43-50.
- Zapata, U. 1995. La biotecnología vegetal como fuente de proyectos para la agroindustria-CIBIOT. Disponible en: <http://www.redbio.org/newsredbio.asp>. [Consultado: 15 febrero 2006].