

Multiplicação *in vitro* e indução de calos embriogênicos em híbrido de manjeriço.

A. S. da Costa¹, M. de F. Arrigoni-Blank¹, J. H. S. Silva¹, M. F. Torres², O. N. A. Santos³, A. F. Blank¹.

¹Departamento de Engenharia Agrônômica, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão-SE, CEP 49100-000.

²Departamento de Engenharia Florestal, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão-SE, CEP 49100-000.

³Departamento de Engenharia de Biosistemas, Escola Superior de Agronomia "Luis de Queiroz", Piracicaba-SP, CEP 13418-900.

deaasc@yahoo.com.br

(Recebido em 02 de outubro de 2014; aceito em 03 de novembro de 2014)

O objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta organogenética *in vitro* em função de reguladores de crescimento e testar a influência do 2,4-D na indução de calos embriogênicos no híbrido de manjeriço 'Sweet Dani' x 'Maria Bonita'. Os ensaios foram implantados em delineamento inteiramente casualizado, sendo o primeiro em esquema fatorial 6x4, com seis concentrações de BAP e quatro de AIA. No segundo ensaio, testou-se quatro tipos de meios de cultura e no terceiro ensaio, avaliou-se cinco concentrações de BAP. No quarto ensaio, avaliou-se o efeito de sete concentrações de BAP combinadas com 0,20 mg.L⁻¹ de ANA. O quinto ensaio foi conduzido em esquema fatorial 5x2x2, testando cinco concentrações de 2,4-D, dois meios de cultura e duas posições da folha. A ausência de BAP e AIA, no meio de cultura, proporcionou maior número de folhas e brotos, e maiores massa fresca e seca de parte aérea dos explantes. A regeneração de brotos via organogênese direta ocorreu quando os explantes foram cultivados com 0,8 mg.L⁻¹ de BAP e na organogênese indireta com 1,9 mg.L⁻¹ de BAP. 2,4-D proporcionou a formação de calos com características embriogênicas nos meios de cultivos testados, independentemente da posição foliar. As concentrações de 0,5 e 1,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D, nos meios MS e MT, e com a folha na posição abaxial, apresentaram maior quantidade de células embriogênicas e formação de embriões globulares.

Palavras-chave: organogênese direta e indireta, carmim acético, *Ocimum basilicum* L.

In vitro multiplication and induction of somatic embryogenesis in hybrid basil.

The aim of this work was to evaluate *in vitro* organogenesis as a function of growth regulators and to test the influence of 2,4-D inducing somatic embryogenesis in basil hybrid 'Sweet Dani' x 'Maria Bonita'. We used the completely randomized design in the trials. In the first experiment, we used a 6x4 factorial scheme, testing six concentrations of BAP and four concentrations of IAA. In the second experiment, we tested four types of culture medium, and in the third assay, we evaluated five concentrations of BAP. In the fourth trial, we evaluated the effect of seven concentrations of BAP combined with 0.20 mg.L⁻¹ of NAA. The fifth experiment was conducted in a 5x2x2 factorial scheme, testing five concentrations of 2,4-D, two culture media and two leaf positions. The absence of BAP and IAA, in the culture medium, resulted in a greater number of leaves and shoots, and higher fresh and dry weight of explant shoots. The shoot regeneration via direct organogenesis occurred when explants were maintained in medium with 0.8 mg.L⁻¹ of BAP, and indirect organogenesis with 1.9 mg.L⁻¹ of BAP. 2,4-D provided the formation of calluses with embryogenic characteristics in the tested media cultures, independently of leaf position. Concentrations of 0.5 and 1.0 mg.L⁻¹ of 2,4-D in MS and MT culture media, with leaf in abaxial position, showed a higher number of embryogenic cells and formation of globular embryos.

Keywords: direct and indirect organogenesis, acetic carmine, *Ocimum basilicum* L.

1. INTRODUÇÃO

O manjeriço (*Ocimum basilicum* L.) é uma planta medicinal e aromática que age contra problemas nas vias respiratórias, contra infecções bacterianas, parasitas intestinais, mau funcionamento dos rins e melhora a digestão dos alimentos [1]; seu óleo essencial é muito

valorizado no mercado, devido ao fato de apresentar princípios ativos importantes, os quais são aplicados nas indústrias de cosmético, perfumaria, alimentícia e farmacêutica para confecção de produtos [2].

Vários fatores interferem no sucesso da propagação *in vitro*, através de qualquer via de regeneração *in vitro*, onde os reguladores de crescimento se destacam como os principais controladores da morfogênese *in vitro*. Dentre as citocininas, o 6-benzilaminopurina (BAP) tem sido muito eficaz para promover a multiplicação em diversas espécies e parece ser a citocinina mais adequada para a multiplicação de parte aérea e indução de gemas adventícias [3]. O efeito fisiológico depende da concentração de cada regulador no meio de cultura, sendo que cada parte da planta responde diferente, às alterações das concentrações de auxinas e citocininas no meio [4].

Para indução de calos embriogênicos, o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), tem sido o mais eficiente e é também utilizado para a indução da embriogênese somática em diferentes espécies e em concentrações variadas, levando as células dos explantes a uma condição de estresse que altera seu metabolismo e resulta na formação do calo [5,6 e 7]. A identificação da presença de células embriogênicas no calo pode ser realizada através da coloração com o corante carmin acético, pois estas células reagem fortemente a esse corante como relatado em estudos citoquímicos, em *Araucaria angustifolia* (Bert.) [8 e 9] e em *Passiflora cincinnata* Mast. [10].

O objetivo deste trabalho foi conduzir experimentos visando avaliar a resposta organogenética *in vitro* em função da utilização do BAP, do ácido naftaleno acético (ANA) e ácido indol acético (AIA), assim como a influência do diclorofenoxiacético (2,4-D) na indução de calos embriogênicos no híbrido de manjeriço.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Como fonte de explante foram utilizados segmentos nodais, internodais e foliares proveniente do híbrido de manjeriço 'Sweet Dani' x 'Maria Bonita' mantido em casa de vegetação. O segundo par de folhas foi coletado, do ápice para a base das plantas. A desinfestação dos explantes foi realizada em duas etapas. A primeira etapa compreendeu a imersão dos segmentos nodais, internodais e foliares em água corrente por 30 minutos. A segunda etapa ocorreu em câmara de fluxo laminar, na qual os segmentos nodais, internodais e foliares foram imersos em álcool etílico 70% por 30 segundos e, em seguida, em solução de hipoclorito de sódio (1,5% segmento foliar e 2,5% segmento intermodal e nodal) por cinco minutos sob agitação, segundo metodologia adaptada [11 e 12]. Por fim, os explantes foram submetidos a três lavagens em água destilada e autoclavada. Em câmara de fluxo laminar, com o auxílio do bisturi e pinça, constantemente flambados, os explantes foram seccionados e inoculados em frascos de 250 mL, contendo 25 mL das concentrações de cada tratamento. Em todos os experimentos o delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, e cada tratamento constituído de cinco repetições, sendo cada repetição representada por quatro frascos contendo dois explantes.

As folhas foram seccionadas com a nervura central e foram feitos cortes paralelos em suas bordas para favorecer maior contato entre o meio de cultura e a superfície do explante.

Para multiplicação dos explantes foram realizados quatro experimentos: No primeiro, utilizaram-se segmentos nodais, instalado em esquema fatorial 6x4, sendo seis concentrações de BAP (0,0; 0,1; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mg.L⁻¹) e quatro concentrações de AIA (0,0; 0,01; 0,08 e 0,17 mg.L⁻¹) no meio MS [13]. No segundo, em virtude da vitrificação ocorrida nas plantas *in vitro*, no primeiro experimento, testaram-se diferentes composições dos meios de cultura. Segmentos nodais foram inoculados, em meio MS, MT [14], ½ MS e ½ nitratos MS. No terceiro, segmentos internodais foram inoculados em meio MT suplementado com cinco concentrações de BAP (0,0; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 mg.L⁻¹). No quarto, segmentos foliares foram inoculados em meio MS suplementado com seis concentrações de BAP (0,0; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 e 6,0 mg.L⁻¹) e 0,20 mg.L⁻¹ de ácido naftaleno acético (ANA) fixo em cada tratamento. O enraizamento das brotações foi realizado em meio ½ MS.

O primeiro, segundo e terceiro experimentos foram incubados em sala de crescimento a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas de luz. Já o quarto e o de indução de calos embriogênicos, foram mantidos em temperatura controlada de $27 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas de luz. A intensidade luminosa foi de $60 \mu\text{mol. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ em todos os experimentos.

Após 30 dias, os explantes foram avaliados quanto número de folhas e brotos por explante, comprimento (cm) médio dos brotos por explante, massa seca e fresca (mg) da parte aérea, vitrificação e oxidação (%), formação de raiz (%). Os dados foram transformados em raiz quadrada de $(x + 0,5)$. As variáveis em porcentagem foram transformadas em arco seno da raiz quadrada de $(X/100)$.

Para a indução de calos embriogênicos foram testados os meios de culturas MS e MT, acrescido de 30 g.L^{-1} (MS) e 25 g.L^{-1} (MT) de sacarose, respectivamente e 7 g.L^{-1} de ágar. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial $5 \times 2 \times 2$, sendo cinco concentrações de 2,4-D (0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mg.L^{-1}), duas posições da folha (abaxial e adaxial) e dois tipo de meio de cultura (MS e MT). O pH dos meios foi ajustado para $5,8 \pm 0,1$, solidificado com ágar e submetido a autoclavagem por 15 minutos ($121 \pm 1^\circ\text{C}$ e 1,05 atm).

Para a confirmação da presença de células pró-embriogênicas nos calos foi realizado o teste com o corante Carmin acético. Foram coletadas frações de 100 mg de calos, macerando-os sobre vidro relógio com auxílio de bastão de vidro. A este macerado adicionou três gotas do corante Azul de Evans a 0,1% por três minutos, retirado o excesso foi adicionado três gotas do corante Carmin acético a 2% [15]. Em seguida, lâminas foram confeccionadas e fotografadas em microscópio estereoscópico em aumento de 10x e 40x .

Aos 30 dias, os calos formados foram avaliados quanto à presença de estruturas embriogênicas, e cobertura dos explantes por calo através de notas (1- 0% de cobertura do explante; 2- 25% de cobertura do explante; 3- 50% de cobertura do explante; 4- 75% de cobertura do explante, 5- 100% de cobertura do explante).

Os resultados foram submetidos à análise de variância e, quando significativos, as médias foram submetidas à análise pelo teste F e para os dados quantitativos aplicou-se regressão polinomial, utilizando o programa SISVAR.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se interação significativa entre BAP e AIA para todas as variáveis analisadas. Para a variável número de folhas a ausência dos reguladores de crescimento no meio de cultura, proporcionou maior número de folhas (13,74). À medida que foi adicionado o BAP e o AIA ao meio de cultura observou-se que não houve diferença significativa entre os tratamentos com as concentrações desses reguladores. Aumentando a concentração de BAP, no meio de cultura, observou uma diminuição do número de folhas (Tabela 1). Resultado contrário foi encontrado em pariparoba (*Pothomorphe peltata* (L.) Miq), onde o maior índice de folhas foi obtido em meio MS adicionado de 0,5; 1,5 e 3,0 mg.L^{-1} de BAP [16].

Houve maior formação de brotos por explante (2,55) no meio sem BAP e AIA, notou-se que nas concentrações de 1,5 e 2,0 mg. L^{-1} de BAP sozinhas ou em interação com as concentrações de AIA não houve formação de brotos (Tabela 1). Em concentrações superiores a 0,5 mg.L^{-1} de BAP houve uma diminuição do número brotos. Fica evidente que a presença de BAP, no meio de cultura, não proporcionou um aumento do número de brotos por explante.

O maior acúmulo de massa fresca e seca de parte área ocorreu na ausência de regulador de crescimento como nas variáveis anteriormente citadas. A partir do tratamento com 0,5 mg.L^{-1} de BAP não houve diferença significativa para massa fresca e seca de parte área (Tabela 1).

Tabela 1: Número de folhas, número de brotos, massa fresca e seca de parte aérea por explante do híbrido de manjeriço 'Sweet Dani' x 'Maria Bonita', em função das concentrações de BAP e AIA.

BAP (mg.L ⁻¹)	AIA (mg.L ⁻¹)				Equação (Y)
	0,0	0,01	0,08	0,17	
-----Número de Folhas-----					
0,0	13,74	7,79	9,76	7,14	13,75-711,68x+12107,40x ² - 47939,42x ³ R ² = 100% **
0,1	8,64	7,70	6,43	7,09	ns
0,5	1,95	0,87	0,60	1,00	ns
1,0	0,65	0,00	0,00	0,00	ns
1,5	0,00	0,00	0,00	0,00	ns
2,0	0,00	0,00	0,00	0,00	ns
Equação (Y)	9,18 -5,24x R ² = 67,63% **	6,12 - 3,55x R ² = 66,79% **	6,36 - 3,72x R ² =62,21% **	5,68 - 3,28x R ² =68,30% **	
CV	27,60 %				
-----Número de Brotos-----					
0,0	2,55	1,68	1,71	1,75	2,56-104,51x+1696,24x ² - 6525,68x ³ R ² = 100% **
0,1	2,30	2,28	1,88	1,85	ns
0,5	1,17	0,27	0,25	0,40	1,17-106,45x+1709,95x ² - 6531,16x ³ R ² = 100% **
1,0	0,35	0,00	0,00	0,00	ns
1,5	0,00	0,00	0,00	0,00	ns
2,0	0,00	0,00	0,00	0,00	ns
Equação (Y)	2,20-1,19x R ² =87,23% **	1,99- 2,77x+0,86x ² R ² =86,19% **	1,82- 2,58x+0,81x ² R ² =91,80% **	1,85- 2,52x+0,77x ² R ² =94,78% **	
CV	18,56 %				
-----Massa fresca de parte aérea (mg)-----					
0,0	689,72	428,48	468,29	652,08	689,72- 30987,18x+505423,79x ² - 1908522,29x ³ R ² = 100% **
0,1	500,34	458,77	365,59	281,48	481,35—1227,84x R ² =97,03% **
0,5	67,86	56,47	9,70	11,78	ns
1,0	15,67	0,00	0,00	0,00	ns
1,5	0,00	0,00	0,00	0,00	ns
2,0	0,00	0,00	0,00	0,00	ns
Equação (Y)	475,21-274,86x R ² =66,10% **	450,24- 641,63x+202,20x ² R ² =91,83% **	321,34- 188,93x R ² =61,36% **	363,33-215,09x R ² =52,43% **	
CV	41,97 %				
-----Massa seca de parte aérea (mg)-----					
0,0	81,21	51,88	50,05	64,58	81,21- 3461,83x+54951,01x ² - 206840,57x ³ R ² =100% **
0,1	53,21	50,32	39,36	29,95	52,44-157,38x R ² =99,74% **
0,5	5,41	4,31	0,82	1,18	ns
1,0	1,37	0,00	0,00	0,00	ns
1,5	0,00	0,00	0,00	0,00	ns
2,0	0,00	0,00	0,00	0,00	ns
Equação (Y)	53,12-30,93x R ² =62,85% **	40,05-23,31x R ² =65,35% **	34,39-20,23x R ² =61,14% **	35,28-20,90x R ² =51,11% **	
CV	34,31%				

Médias seguidas das mesmas letras minúsculas entre genótipos não diferem entre si pelo teste de Tukey (p≤0,05). *Significância de p≤0,05.

No ensaio observou-se a presença de plantas com hiperidricidade, o que não é interessante no processo de multiplicação da espécie *in vitro*, uma vez que a hiperidricidade causa uma série de anomalias na planta e nos brotos, como folhas túrgidas, translúcidas, rígidas,

e quebradiças. Algumas pesquisas relatam que a hiperidricidade pode ocorrer devido ao desequilíbrio dos componentes do meio de cultura, especialmente dos reguladores de crescimento [17 e 18], devido à presença de altas concentrações dos mesmos [19].

Também, verificou-se que à medida que aumentou a concentração de BAP houve formação de calo na base dos explantes. Em outras espécies, como paricá (*Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke) [20], foi verificada maior incidência de calos na base do explante à medida que foi aumentando a concentração do regulador de crescimento no meio de cultura. Em explantes caulinares de mangabeira, a ocorrência de calos na base dos explantes, aumentou com o acréscimo de BAP ao meio de cultura, até a concentração de 4,0 mg.L⁻¹ [21].

Em virtude, de no experimento com BAP e AIA as plantas e as brotações *in vitro* apresentarem sintomas de hiperidricidade, realizou-se um experimento testando vários tipos de meios de cultura. No experimento foi constatado que não houve interação significativa entre os meios de cultura e as variáveis analisadas, exceto para número de folhas e massa fresca de parte aérea. O maior número de folhas foi obtido no meio MS e MT, porém não diferindo estatisticamente do meio com ½ nitratos MS. Em relação, a massa fresca de parte aérea (mg) o meio MS, proporcionou maior acúmulo de massa, não diferindo do meio MT e ½ nitratos MS (Tabela 2).

Tabela 2: Número de folhas e brotos por explante, comprimento de brotos (cm) por explante, massa fresca e seca (mg) de parte aérea (MFPA e MSPA) e vitrificação (%) em explantes de manjeriço, em função dos diferentes tipos de meio.

Meios	Nº de Folha	Nº de broto	Comprimento de broto (cm)	MFPA (mg)	MSPA (mg)	Vitrificação (%)
MS	18,67 a	2,02 a	4,90 a	504,0 a	60,0 a	22,5 a
MT	16,29 a	1,67 a	5,55 a	486,0 ab	57,0 a	10,0 a
½ MS	10,52 b	1,69 a	3,36 a	294,0 b	38,0 a	27,5 a
½ Nitratos MS	14,97 ab	1,78 a	5,00 a	462,0 ab	51,0 a	20,0 a
CV(%)	20,13	16,60	27,09	25,49	28,20	60,74

Médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

Um dos fatores que promove a hiperidricidade das plantas *in vitro* é a concentração de sais presente no meio de cultura. Porém, nesse trabalho não foi verificado isso, pois a comparação entre os diferentes meios de cultura não teve efeito significativo para a esse fator. Indicando que a redução da hiperidricidade das plantas *in vitro* de manjeriço pode estar relacionada a outro fator. Além do meio de cultura, as condições atmosféricas do ambiente de cultivo podem induzir a formação de tecidos hiperídricos [22], bem como o tipo e a concentração do agente geleificante, no meio de cultura, que também podem contribuir para evitar ou promover a hiperidricidade [23 e 24].

No experimento de organogênese direta do manjeriço, observou-se inicialmente um intumescimento das extremidades dos explantes, onde ocorreu a formação de gemas adventícias, a partir do décimo dia de cultivo *in vitro*, sendo que a formação de brotos foi observada a partir do vigésimo dia de cultivo.

Pode-se inferir que a suplementação do meio de cultura com citocinina foi essencial para o desenvolvimento de brotações, uma vez que na ausência de BAP, os explantes oxidaram ou formaram raízes, o surgimento de raízes no explante pode ser justificado devido à alta concentração de auxina endógena no explante, que favorece ao aparecimento de raiz. Percebeu-se que com o aumento da concentração de BAP no meio de cultura aumentou, também, a oxidação do explante (Tabela 3).

No número de brotos por explante foi observado um aumento de forma cúbica até o ponto máximo estimado de 0,5 na concentração de 0,8 mg.L⁻¹ de BAP (Tabela 3). Resultados contrários foram obtidos em *Ocimum basilicum*, usando explantes internodais, onde as concentrações de 2,0 e 4,0 mg.L⁻¹ de BAP apresentaram melhor resultado, com médias de 7,71 e 4,57 respectivamente para número de brotações. Isto sugere que, dentro de uma mesma espécie, podem ocorrer respostas diferentes dos genótipos em relação aos processos morfogênicos *in*

in vitro. Em *Mentha arvensis*, o explante intermodal na presença de BAP não proporcionou regeneração de plantas [25].

Tabela 3: Oxidação (%), formação de raiz (%) e número de brotos por explante, do híbrido 'Sweet Dani x Maria Bonita', no meio MT, em diferentes concentrações de BAP.

BAP (mg.L ⁻¹)	Oxidação (%)	Formação de raiz (%)	Número de brotos por explante
0,0	7,5	72,5	0,0
1,0	12,5	0,0	0,6
2,0	75,0	0,0	0,0
3,0	85,0	0,0	0,0
4,0	75,0	0,0	0,2
Equação (Y)	$-2,28+44,32x-5,89x^2$ $R^2= 84,33^{**}$	$64,21-65,93x+10,36x^2$ $R^2= 85,71^{**}$	$0,03+1,04x-0,71x^2+0,12x^3$ $R^2= 74,58^{**}$
CV (%)	31,00	63,35	20,72

** Significância de 0,05%.

No experimento da organogênese indireta de manjeriço, houve interação significativa entre BAP e ANA, os valores de formação de calo (%) são explicados por uma equação cúbica, com o ponto máximo de 2,8 mg.L⁻¹ de BAP + 0,2 mg.L⁻¹ de ANA com 52% de formação de calo. A variável calo com raiz (%) é explicada por uma equação cúbica, com o ponto máximo de 2,08 mg.L⁻¹ de BAP + 0,2 mg.L⁻¹ de ANA com 58% de formação de calo com raiz (Tabela 4).

Tabela 4: Formação de calo (%), Calo com raiz (%) e número de brotos por calo em função do meio MS, em diferentes concentrações de BAP e 0,2 mg.L⁻¹ de ANA fixo em cada tratamento.

BAP (mg.L ⁻¹)	Formação de calo (%)	Calo com Raiz (%)	Número de brotos por calo
Controle	0,0	00,0	0,0
1,0	12,5	62,5	1,6
2,0	17,5	60,0	1,5
3,0	67,5	25,0	0,5
4,0	85,0	10,0	0,4
5,0	92,5	0,0	0,6
6,0	97,5	0,0	0,4
Equação (Y)	$0,47-2,77x+11,42x^2-1,38x^3$ $R^2= 92,11^{**}$	$4,04+78,40x-31,81x^2+3,12x^3$ $R^2= 92,74^{**}$	$0,16+1,72x-0,69x^2+0,07x^3$ $R^2=71,82^{**}$
CV (%)	29,85	58,94	34,02

** Significância de 0,05%.

Em relação à característica número de brotos por calos foi explicada, por uma equação cúbica, com ponto máximo 1,9 mg.L⁻¹ de BAP com 1,3 brotos por calo. A concentração de BAP teve um efeito significativo sobre o número de brotos por calo, onde todos os tratamentos acrescidos com o regulador apresentaram brotos, sendo a concentração de 1,0 mg.L⁻¹, a que proporcionou um maior número de brotos em quinze dias de cultivo (Tabela 4 e Figura 1). A combinação de BAP e ANA também foi efetiva na regeneração de brotos a partir de calos em manjeriço cultivado em meio contendo 5,0 mg.L⁻¹ de BAP e 0,2 mg.L⁻¹ de ANA [26].

Em todos os tratamentos, com regulador de crescimento, houve formação de calos com brotos, calos com raízes e calos sem raízes. Esses três tipos de calos, às vezes, foram observados no mesmo tratamento. Os calos organogênicos apresentavam pontos esverdeados e pequenos primórdios foliares, que indicavam a formação de gemas e posteriormente formação de brotos. O enraizamento das brotações foi realizado em meio ½ MS, o qual foi favorável ao desenvolvimento do sistema radicular das brotações. Resultados semelhantes foram obtidos utilizando explantes foliares de genótipos de *Passiflora* [27 e 28].

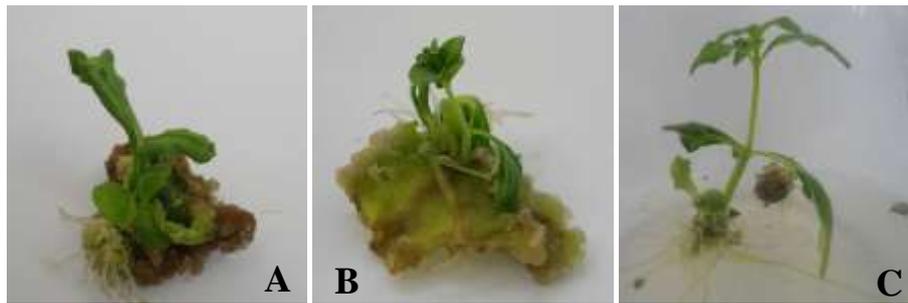


Figura 1: Organogênese indireta em explante foliar de 'Sweet Dani' x 'Maria Bonita' após 30 dias de cultivo. Calo com raízes e brotos (A e B), brotação enraizada in vitro (C).

Na indução de calos embriogênicos verificou-se que o híbrido 'Sweet Dani' x 'Maria Bonita' apresentou capacidade de embriogênese somática indireta, induzindo calos embriogênicos e posteriormente embriões na fase globular.

De acordo com a análise de variância e teste de regressão, houve interação significativa para a variável cobertura do explante por calo entre as concentrações de 2,4-D, meios de cultivo e a posição foliar (Tabela 5). Na variável porcentagem de cobertura do explante por calo, não houve desenvolvimento de calos no tratamento sem suplementação do 2,4-D evidenciando, assim, a importância da utilização do regulador de crescimento para indução da divisão celular e, conseqüentemente, para formação de calos embriogênicos para a espécie em estudo. Observou-se a indução de calo, começando, nas bordas do explante e proliferando-se para parte superior do explante (Figura 2).

Tabela 5: Cobertura do explante por calo em função do meio MS e MT, posição do explante e diferentes concentrações de 2,4-D.

2,4- D (mg.L ⁻¹)	Meio MS		Meio MT	
	Abaxial	Adaxial	Abaxial	Adaxial
0	1,0aA	1,0aA	1,0aA	1,0aA
0,5	2,52aA	1,65bB	2,34bA	4,10aA
1,0	2,23aA	1,55bB	2,08bA	3,93aA
1,5	2,28aA	1,10bB	2,55bA	4,18aA
2,0	2,28aA	1,20bB	1,68bB	3,23aA
Equação (Y)	1,14+1,91x- 0,69x ²	0,99+2,66x- 3,02x ² +0,87x ³	1,08+2,42x- 1,05x ²	1,29+5,22x- 2,14x ²
	R ² = 85,77**	R ² = 98,85**	R ² = 81,37**	R ² = 87,84**
CV (%)	21,49			

Médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas linhas entre posição da folha no mesmo meio de cultivo, maiúsculas nas linhas entre mesma posição da folha e entre meios de cultivo, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Com notas que variam de 1 (0%); 2 (25%); 3 (50%); 4 (75%) e 5 (100%).

** Significância a $p \leq 0,05$.

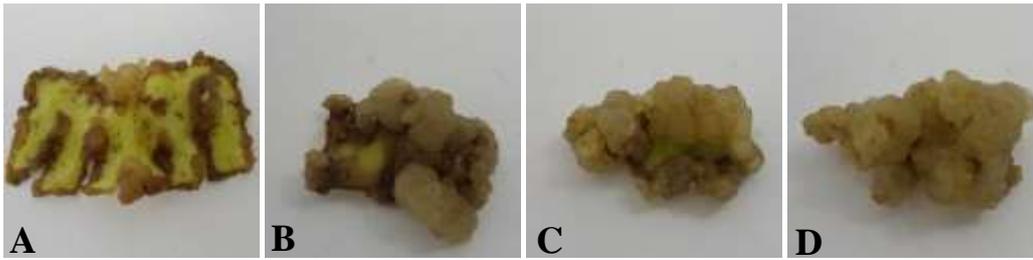


Figura 2: Formação de calo em explante foliar de 'Sweet Dani' x 'Maria Bonita', com 30 dias de cultivo em meio MS nas concentrações de 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D, sendo 25% (A), 50% (B), 75% (C) e 100% (D). Tamanho dos calos (A) = 1,7 cm; (B) = 1,9 cm; (C) = 2,0 cm; (D) = 2,0 cm.

Nos meios MS e MT houveram diferenças significativas em relação a porcentagem de cobertura dos explantes por calo nas duas posições da folha, sendo que no meio MS a posição abaxial quando comparada a adaxial, proporcionou uma maior indução de calo na concentração 0,5 mg.L⁻¹ de 2,4-D. Porém, no meio MT a maior indução de calo ocorreu na posição adaxial nas concentrações de 0,5 a 1,5 mg.L⁻¹ de 2,4-D (Tabela 5). Tanto no meio MS (abaxial) quanto no meio MT (adaxial), ambas as posições da folha foram representadas por uma curva com tendência quadrática, onde para a posição abaxial no meio MS a dose de 1,37 mg.L⁻¹ de 2,4-D correspondeu ao ponto máximo da curva, atingindo cobertura máxima do explante por calo de 2,46, de acordo com a equação derivada. Para a posição adaxial no meio MT a dose de 1,2 mg.L⁻¹ de 2,4-D correspondeu ao ponto máximo da curva, atingindo cobertura máxima do explante por calo de 4,47, de acordo com a equação derivada. Este comportamento quadrático indicou que as concentrações acima e a abaixo de 1,37 e 1,2 mg.L⁻¹ de 2,4-D tiveram tendência de redução da porcentagem de cobertura do explante por calo. Entre as auxinas sintéticas usadas para induzir a embriogênese somática, o 2,4-D tem sido a mais eficiente e mais utilizada [6], pois induz genes responsáveis pela sinalização do processo de embriogênese somática [29].

O 2,4-D aplicado a explante foliar de *Ocimum basilicum* L. cv. Maria Bonita propiciou a indução de calos [30], assim como em outro trabalho realizado com a mesma espécie, onde foi observado que a concentração de 0,5 mg L⁻¹ de 2,4-D e a combinação de 0,5 mg L⁻¹ de 2,4-D e 1,0 mg L⁻¹ de BAP proporcionaram maior porcentagem de indução de calos [31].

Apesar do meio de cultivo MT e o explante na posição adaxial, ter proporcionado maior formação de calo, houve menos células embriogênicas de acordo com a dupla coloração carmin acético/azul de Evans. Nem sempre a maior formação de calo vai proporcionar maior quantidade de células embriogênicas, pois além das condições de cultivo, o estágio de desenvolvimento e as condições fisiológicas do explante, como por exemplo, o conteúdo hormonal endógeno pode influenciar na formação de células embriogênicas [32].

Os calos apresentaram coloração variada, consistência firme e globulares (Figura 3). Estas estruturas globulares embriogênicas foram numerosos e cobriam a maior parte da superfície do calo que não estava em contato direto com o meio de cultivo. Resultados semelhantes foram relatados para coco [33], *Heliconia chartacea* [34] e guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) [35]. Observou-se ainda que dentro do mesmo tratamento haviam calos embriogênicos e não embriogênicos. Essa variação na formação de calos embriogênicos no mesmo tratamento pode ser em decorrência dos gradientes hormonais presentes na planta e dentre as diferentes partes vegetais das plantas usadas como fontes de explantes. Resultados similares foram observados em explantes de genótipos de batata-doce, os quais não responderam da mesma maneira ao efeito dos tratamentos com reguladores de crescimento [36].



Figura 3: Aparência morfológica de embriões somáticos em estágio globular em explante foliar de 'Sweet Dani' x 'Maria Bonita', com 30 dias de cultivo em meio MS com $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D. (A) = aumento de 40x; (B) e (C) 2,0 cm.

Realizando a análise das células dos calos, com a dupla coloração Carmin acético/azul de evans (Figura 4) observou-se, nas concentrações de 0,5 e $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D na posição abaxial tanto no meio MT quanto no MS, células redondas, pequenas, com citoplasma denso e agrupadas, com reação positiva ao corante carmin acético (Figura 5) demonstrando características de células com potencial embriogênico. As células não embriogênicas com núcleos pequenos, citoplasma menos denso, alongadas, altamente vacuoladas foram coradas pelo corante azul de Evans. Dessa forma, os agregados celulares apresentam variação no tamanho e morfologia, revelando diferentes afinidades com os corantes durante a análise, conforme observado por [8, 9 e 10].

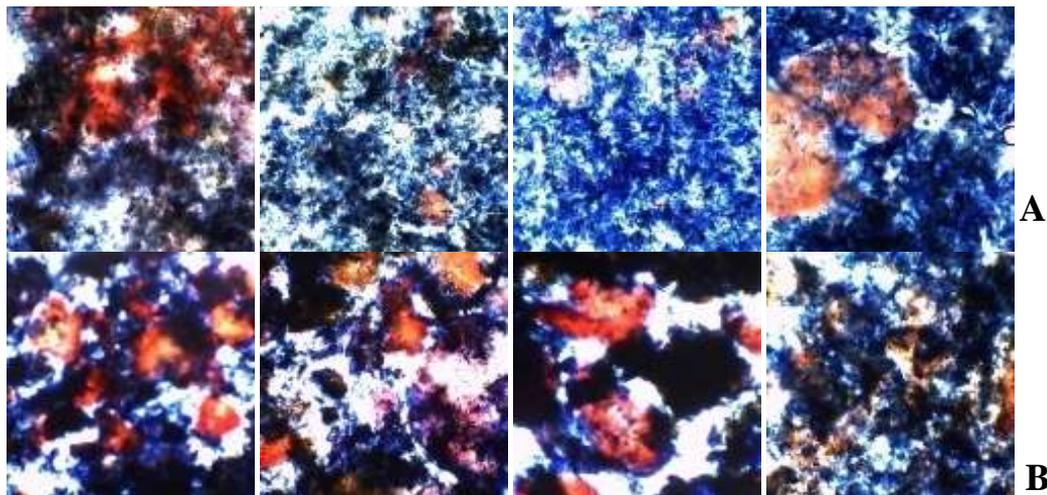


Figura 4: Análise com carmin acético e azul de Evans em calos embriogênicos a partir de explantes foliares (posição abaxial) do híbrido de manjerição 'Sweet Dani' x Maria bonita', com 30 dias de cultivo em meio de cultura MT (A) e MS (B) suplementado com 0,5; 1,0; 1,5 e $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D (Aumento de 10x).

A reação positiva ao carmin acético está associada à competência da célula para o desenvolvimento celular [37 e 8]. A presença de células isodiamétricas, pequenas em suspensão celular de *Agave tequilana* Weberfoi detectada com o uso dos corantes Carmin acético e azul de Evans [38]. O 2,4-D é responsável pelo início do processo de divisão e diferenciação celular, bem como age na indução de células embriogênicas [39]. Esta capacidade do 2,4-D em desencadear as rotas embriogênicas pode estar relacionada com a sua capacidade de induzir o estresse, os quais contribuem para a reprogramação celular de células somáticas em direção à embriogênese [16].

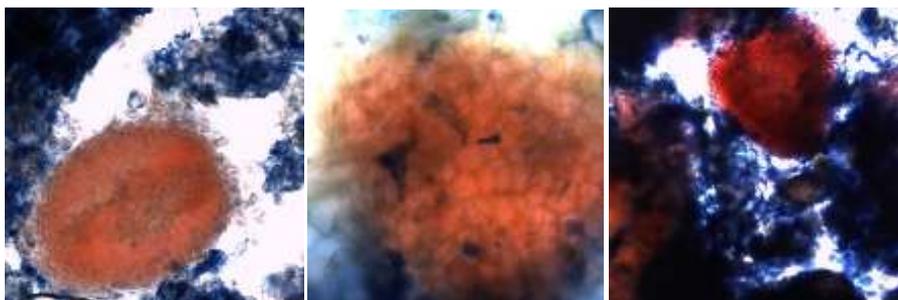


Figura 5: Massas de células pró-embriônicas de manjericao com 30 dias de cultivo em meio MS e MT com $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ 2,4-D reagindo com a dupla coloração de Carmin acético / azul de Eva (Aumento de 40x).

O 2,4-D induziu calos embriogênicos, com presença de embriões globulares, em explantes foliares do híbrido ‘Sweet Dani’ x ‘Maria Bonita’, porém a oxidação dos calos foi observada com o subcultivo. Resultados semelhantes foram observados em cultivares de uva [41]. Testaram-se, também, outros reguladores de crescimento, meio MS sem regulador para a conversão dos embriões em plantas, mas nenhum resultado foi satisfatório até o momento. Mais pesquisas precisam ser realizadas para concluir o processo da embriogênese no híbrido de manjericao ‘Sweet Dani’ x Maria Bonita’.

4. CONCLUSÕES

Os segmentos nodais apresentaram melhores respostas quanto às características fitotécnicas em meio de cultura sem regulador de crescimento.

A regeneração de brotos via organogênese direta ocorreu quando os explantes foram cultivados com $0,8 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP e para a organogênese indireta com $1,9 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP.

O 2,4-D calos embriogênicos nas concentrações de $0,5$ e $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D com o explante na posição abaxial, em meio MS ou MT, com o desenvolvimento de embriões somáticos globulares.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a FAPITEC/ SE, CNPq e CAPES pelo apoio financeiro deste trabalho.

1. Lorenzi H, Matos FJA. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 2008, 544 p.
2. Liber Z, Carovic´-Stanko K, Politeo O, Strikic´ F, Kolak I, Milos M, et al. Chemical Characterization and Genetic Relationships among *Ocimum basilicum* L. Cultivars. Chemistry & Biodiversity. 2011; 8:1978-1989.
3. Grattapaglia D, Machado MA. Micropropagação. In: Torres AC, Caldas LS, Buso JA (Eds.). Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: EMBRAPA –CNPq. 1998; 183-260.
4. Pozo JCD, Lopez-Matas MA, Ramirez-Parra E, Gutierrez C. Hormonal control of the plant cell cycle. Biologia Plantarum. 2005; 123:173-183.
5. Fehér A, Pasternak T, Ötvös K, Miskolczi P, Dudits D. Induction of embryogenic competence in somatic plant cells: a review. Biologia. 2002; 57:5–12.
6. Fehér A, Pasternak TP, Dudits D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2003; 74 (3):201- 228.
7. Zhang CX, Li Q, Kong L. Induction, development and maturation of somatic embryos in Bunge's pine (*Pinus bungeana* Zucc. ex Endl.). Plant Cell Tissue and Organ Culture. 2007; 91:273-280.
8. Steiner N, Vieira FN, Maldonado S, Guerra MP. Effect of carbon source on morphology and histodifferentiation of *Araucaria angustifolia* embryogenic cultures. Brazilian Archives of Biology and Technology. 2005; 48 (6):895-903.

9. Silveira V, Santa-Catarina C, Tun NN, Scherer GFE, Handro W, Guerra MP, et al. Polyamine effects on the endogenous polyamine contents, nitric oxide release, growth and differentiation of embryogenic suspension cultures of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. *Plant Science*. 2006; 171 (1):91-98.
10. Silva ML da, Pinto DLP, Guerra MP, Floh ES, Bruckner CH, Otoni WC. A novel regeneration system for a wild passion fruit species (*Passiflora cincinnata* Mast.) based on somatic embryogenesis from mature zygotic embryos. *Plant Cell Tissue Organ Culture*. 2009; 99:47-54.
11. Phippen WB, Simon JE. Shoot regeneration of young leaf explants from basil (*Ocimum basilicum* L.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. 2000; 36:250-254.
12. Sahoo Y, Pattnaik SK, ChandPK. *In vitro* clonal propagation of an aromatic medicinal herb *Ocimum basilicum* L. (Sweet basil) by axillary shoot proliferation. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. 1997; 33:293-296.
13. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*. 1962; 15:473-497.
14. Murashige T, Tucker DPH. Growth factor requirement of citrus tissue culture. In: *INTERNACIONAL CITRUS SYMPOSIUM, Proceedings*. Riverside: University of California. 1969; 3:1155-1169.
15. Valente, C. Caracterização de fungos mitocondriais de *Araucaria angustifolia*. Dissertação de Mestrado. Curitiba PR: Universidade Federal do Paraná. 2007. 97p.
16. Schwertner ABS, Nagao EO, Hidalgo AF, Zaffari GR. Efeito do 6- benzilaminopurina (BAP) e do ácido indolacético (AIA) na propagação *in vitro* da caapeba [*Pothomorphe peltata* (L.) Miq.]. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. 2008; 10 (1):76-81.
17. Oliveira AKD, Canal MA, Centeno ML, Feito I, Fernández B. Endogenous plant growth regulators in carnation tissue cultures under different conditions of ventilation. *Plant Growth Regulation*. 1997; 22:169-174.
18. Joyce SM, Cassells AC, Jain SM. Stress and aberrant phenotypes in *in vitro* culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 200; 74:103-121.
19. Picoli EAT, Otoni, WC, Figueira ML, Carolino SMB, Almeida RS, Silva EAM, Carvalho CR, Fontes EPB. Hyperhydricity in *in vitro* eggplant regenerated plants: structural characteristics and involvement of BiP (Binding Protein). *Plant Science*. 2001; 160:857-868.
20. Cordeiro IMCC, Lameira AO, Ohashi ST, Rosal LF. Efeito do BAP sobre a proliferação de brotos *in vitro* de *Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke (paricá). *Cerne*. 2004; 10 (1):118-124.
21. Soares FP, Paiva R, Alvarenga AAde, Nogueira RC, Emrich EB, Martinotto C. Organogênese direta em explantes caulinares de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). *Ciência Agrotécnica*. 2007; 31 (4):1048-1053.
22. Kevers C, Gaspar T. Vitrification of carnation *in vitro*: changes in water content, extracellular space, air volume, and ion levels. *Physiologie Vegetale*. 1986; 244:647-653.
23. Debergh PC. Effects of Agar brand and concentration on the tissue culture medium. *Physiologia Planta*. 1983; 59:270-276.
24. Ziv M. Quality of micropropagated plants – vitification. *In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. 1991; 27:64-69.
25. Arrigoni-Blank M de F, Costa, AS, Fonseca VO, Alves PB, Blank AF. Micropropagação, aclimatização, teor e composição química do óleo essencial de genótipos de hortelã japonesa. *Revista Ciência Agronômica*. 2011; 42 (1):175-184.
26. Dode LB, Bobrowski VL, Braga EJB, Seixas FK, Schuch MW. *In vitro* propagation of *Ocimum basilicum* L. (Lamiaceae). *Acta Scientiarum*. 2003; 25 (2):435-437.
27. Monteiro ACB de A, Nakazawa GT, Mendes BMJ, Rodriguez APM. Regeneração *in vitro* de *Passiflora suberosa* a partir de discos foliares. *Scientia Agrícola*. 2000; 57 (3): 571-573.
28. Figueiredo MA de, Paiva R, Souza AC de, Porto JMP, Nogueira GF, SOARES FP. Indução *in vitro* de calos em duas espécies de maracujazeiro nativo. *Revista Brasileira de Biociências*. 2007; 5:288-290.
29. Campos JMS, Calderano C de A, Pereira AV, Davide LC, Viccini LF, Santos M de O. Embriogênese somática em híbridos de *Pennisetum* sp. e avaliação de estabilidade genômica por citometria. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 2009; 44 (1):38-44.
30. Rosado LDS, Pinto JEBP, Botrel PP, Blank AF, Bertolucci SY. Aspectos do cultivo *in vitro* do manjeriço cv. Maria Bonita (*Ocimum basilicum* L.). *Plant Cell Culture Micropropagation*. 2009; 5 (2):71-78.

31. Gopi C, Sekhar YN, Ponnurugan P. *In vitro* multiplication of *Ocimum gratissimum* L. through direct regeneration. *African Journal of Biotechnology*. 2006; 5 (9):723-726.
32. Jiménez VM. Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*. 2001; 13 (2):196-223.
33. Saénz L, Azpeitia A, Chuc-Armendariz B, Chand JL, Verdeil JL, Hocher V, Oropeza C. Morphological and histological changes during somatic embryo formation from coconut plumule explants. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*. 2006; 42:19-25.
34. Ulisses C, Camara TR, Willadino L, Albuquerque CC de, Brito JZ de. Early Somatic Embryogenesis in *Heliconia chartacea* Lane ex Barreiros cv. Sexy Pink Ovary Section Explants. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2010; 53 (1):11-18.
35. Angelo PC da S, Moraes LAC, Sousa NR, Quisen RC. Indução de *calli* em explantes de guaranázeiro visando a embriogênese somática. *Revista Brasileira de Agrociência*. 2010; 16 (1-4):133-137.
36. Magalhães JS, Santos MDM, Cunha Filho FN, Blumer L, Guerra MP, Torres AC. Indução de embriogênese somática em genótipos de batata-doce. *Horticultura Brasileira*. 2006; 24:79-83.
37. Durzan DJ. Process control in somatic polyembryogenesis. In: SYMPOSIUM DEPARTMENT OF FOREST GENETICS AND PLANT PHYSIOLOGY, 1988, Swedish. Proceedings... Swedish: University of Agricultural Sciences. 1988; 8:147-186.
38. Santacruz-Ruvalcaba F, Portillo L. Thin cell suspension layer as a new methodology for somatic embryogenesis in *Agave tequilana* Weber cultivar azul. *Industrial Crops and Products*. 2009; 29:609-614.
39. Pasternak TP, Prinsen E, Ayaydin F, Miskolczi P, Potters G, Asard H, et al. The Role of Auxin, pH, and Stress in the Activation of Embryogenic Cell Division in Leaf Protoplast-Derived Cells of Alfalfa. *Plant Physiology*. 2002; 129:1807-1819.
40. Kitamiya E, Suzuki S, Sano T, Nagata T. Isolation of two genes that are induced upon the initiation of somatic embryogenesis on carrot hypocotyls by high concentration of 2,4-D. *Plant Cell Repor*. 2000; 19:551-557.
41. Prado MJ, Grueiro MP, González MV, Testillano PS, Domínguez C, López M, et al. Efficient plant regeneration through somatic embryogenesis from anthers and ovaries of six autochthonous grapevine cultivars from Galicia (Spain). *Scientia Horticulturae*. 2010; 125 (3):342-352.