



# PRODUÇÃO DE PLANTAS DE *Ocimum basilicum* L. VIA REGENERAÇÃO INDIRETA A PARTIR DE EXPLANTES FOLIARES, MICROPROPAGAÇÃO E ACLIMATIZAÇÃO

## PLANT PRODUCTION OF *Ocimum basilicum* L. BY INDIRECT REGENERATION FROM LEAVES EXPLANTS, MICROPROPAGATION AND ACCLIMATIZATION

Roberson Dibax<sup>1</sup>; Dieni Chrusciak Piovesan Birck<sup>2</sup>; Jean Carlos Zocche<sup>3</sup>; Diogo José Siqueira<sup>4</sup>; Ana Cristina Martins Vaz<sup>5</sup>; Sueli Campagnin<sup>6</sup>; Luiz Eduardo Babaresco<sup>7</sup>; Maycon Rodrigo Petrechen<sup>8</sup>

<sup>1</sup> Eng. Agrônomo professor pesquisador da universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Laranjeiras do Sul. Rodovia BR 158 - Km 405, CEP 85301-970. E mail: [Apresentador do trabalho](#); <sup>2</sup> Eng<sup>a</sup> Agrônoma egressa da Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Laranjeiras do Sul.; <sup>3</sup> Eng. Agrônomo doutorando em produção vegetal pelo Programa de pós graduação da Universidade Estadual do Centro Oeste - Unicentro.; <sup>4</sup> Biólogo da Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Laranjeiras do Sul.; <sup>5,6,7,8</sup> Acadêmicos (as) do Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas da Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Laranjeiras do Sul. Integrantes do Projeto Escola,

### INTRODUÇÃO

O manjerição (*Ocimum basilicum* L.) é uma planta herbácea pertencente à família Lamiaceae. É uma planta aromática, rica em óleos essenciais que contém em sua fração compostos terpenóides e fenilpropanóides, de ampla utilização como condimento, ornamental, indústria de cosméticos, perfumaria e fármacos (RIBEIRO et al., 2007). Estudos de transformação genética e expressão gênica da biossíntese de óleos essenciais já foram demonstrados para esta espécie (Deschamps e Simon, 2002; Navet e Tian 2020) e atualmente a tecnologia CRISPRCas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) tem sido utilizada para a obtenção de plantas de manjerição editadas genômica (Navet e Tian, 2020;). Embora a biotecnologia esteja bastante avançada para esta cultura, observa-se que o principal problema concentra-se no fato de que as taxas de regeneração de plantas transformadas e editadas são baixas, tornando-se necessários estudos que maximizem as taxas de regeneração indireta de plantas de *Ocimum basilicum* L. Neste contexto, os objetivos deste trabalho foram disponibilizar um protocolo de regeneração indireta via explantes foliares, micropropagação e aclimatização para a espécie.

### MATERIAL E MÉTODOS

#### Local e realização dos experimentos e material vegetal e condições gerais de cultura in vitro e meio de cultura de base e recipientes

Este trabalho foi conduzido nos laboratórios didáticos do campus da Universidade Federal da Fronteira Sul, localizado em Laranjeiras do Sul, Paraná. As sementes de manjerição (*Ocimum basilicum*) da cultivar Gemini foram adquiridas da empresa Isla Multi<sup>®</sup>.

As culturas *in vitro* foram conduzidas em câmara de germinação BOD, sob luz fluorescente branca fria com densidade de fluxo fotossintético de 40  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ , fotoperíodo de 16:8 e temperatura de  $25 \pm 2$  °C. O meio de cultura de base foi MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) na sua formulação original, pH ajustado a 5,8 e autoclavados durante 20 min a 120°C. O material vegetal foi isolado em placas de Petri de 10 cm de diâmetro e 2 cm de altura contendo 30 mL de meio e vedadas com filme PVC, ou em



frascos de vidro de 6 cm de diâmetro e 9 cm de altura, contendo 40 ml do meio de cultura e vedados com tampa de polipropileno rígido.

O meio de cultura de base foi MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) na sua formulação original, pH ajustado a 5,8 e autoclavados durante 20 min a 120°C.

#### Experimento de desinfestação das sementes

Todas as sementes exceto as utilizadas no tratamento controle foram submetidas a um pré-tratamento em etanol 70% durante 2 minutos. Em seguida foram adicionadas as concentrações de hipoclorito de sódio respectivas a cada tratamento durante 20 minutos e finalizado o processo com enxágüe triplo com água deionizada autoclavada. Os tratamentos com hipoclorito de sódio comparados foram os seguintes: T1 - controle, T2: 2,5%, T3: 5%, T4: 7,5%, T5: 10%.

As sementes foram isoladas em placas de Petri contendo meio de cultura e incubadas na presença de luz. As avaliações foram realizadas após 28 dias de acordo com a porcentagem de sementes germinadas e porcentagem de sementes contaminadas por fungos ou bactérias. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 7 repetições e 12 sementes por unidade experimental.

#### Efeito do thidiazuron (TDZ) na regeneração indireta de brotações via explantes foliares

As sementes foram desinfestadas de acordo com o melhor resultado obtido na etapa anterior e isoladas em placas-de-Petri contendo o meio de cultura MS e mantidas em câmara de BOD. Após 45 dias de cultivo, os segmentos foliares oriundos das plântulas germinadas foram cortados no tamanho de 5 x 5 mm e isolados em frascos contendo o meio de cultura acrescido de thidiazuron (TDZ). Os tratamentos foram as seguintes concentrações de TDZ: T1. Controle (Sem TDZ), T2. 0,1 mg, T3. 0,5 mg, T4. 0,75 mg e T5. 1,0 mg. Aos 28 dias, as porcentagens de explantes formando calos, porcentagem de explantes regenerando foram analisadas. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 7 repetições e 5 explantes foliares por unidade experimental.

#### Alongamento, enraizamento e aclimatização

Segmentos nodais de 5 mm retirados de plântulas cultivadas *in vitro* foram isolados em meio de cultura MS durante 28 dias para promover o alongamento e enraizamento das plântulas. Após este período, 120 plantas desenvolvidas *in vitro* foram avaliadas de acordo com o tamanho (cm) e porcentagem de enraizamento e oxidações. Após esta etapa, as plantas foram lavadas em água corrente para a retirada dos resíduos de meio de cultura e transplantadas para tubetes contendo o substrato composto por vermiculita, casca de arroz carbonizada e substrato Plantmax® na proporção 1:1:1. As plântulas foram cultivadas em casa de vegetação durante 10 dias em sistema de nebulização e após transferidas para o ambiente sem nebulização. Aos 28 dias, foram analisadas a taxa de plantas aclimatizadas e plantas mortas.



Todos os dados das características avaliadas foram submetidos a análises de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), sendo o programa utilizado Assistat 7.7 beta.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados médios das características agrônômicas avaliadas estão apresentados na **Tabela 1** e **Tabela 2**, após 28 dias do cultivo *in vitro*.

**TABELA 1** - Efeito do pré-tratamento com etanol 70 % e do hipoclorito de sódio nas porcentagens de germinação e contaminação em sementes de *Ocimum basilicum* L. após 28 dias de cultivo em meio de cultura MS

Concentrações de hipoclorito de sódio (%)	Germinação (%)	Contaminação (%)
Controle	0,0 d	90,00 a
2,5	25,0 a	5,00 b
5	5,00 b	12,50 c
7,5	5,00 b	12,50 c
10	2,00 c	12,50 c

As médias seguidas das mesmas letras na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Com relação aos resultados referentes ao experimento de assepsia e germinação de sementes, a Anova revelou diferenças estaticamente significativas entre os tratamentos para as duas variáveis analisadas. O teste de Tukey ao nível de 0,05 % de significância demonstrou que o melhor resultado foi obtido com a concentração de 2,5 de hipoclorito de sódio no qual 25 % de plantas tiveram sua germinação e 5% de contaminações fúngicas e bacterianas (**Tabela 1**). Resultados diferenciados foram observados no trabalho de Arruda et al. (2012) onde a utilização concentrações de 1 a 10% para a desinfestação das sementes de *Ocimum basilicum* L. no qual relatam que as médias observadas para esta variável e para as taxas de germinação não apresentaram diferenças significativas.

**TABELA 2** - Efeito do TDZ nas porcentagens de explantes foliares formando calos, calos regenerando brotações e oxidação em explantes foliares de *Ocimum basilicum* L., após 28 dias de isolamento em meio de cultura MS

Tratamentos (mg)	Calogênese	Regeneração dos brotos
0	25,33 d	0,00 d
0,25	60,13 c	25,0 b
0,5	85,20 a	45,0 a
0,75	75,44 b	12,5 c
1	79,61 b	12,5 c

Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade



Com relação aos resultados referentes ao efeito do TDZ (**Tabela 2**), a Anova demonstrou que houveram interações significativas entre os tratamentos comparados para as duas variáveis analisadas. O teste de Tukey comprovou que para as variáveis porcentagem de explantes formando calos e brotações o melhor tratamento foi o contendo 0,5 mg.L de TDZ, no qual foram obtidas as médias de 85,20% e 45,00% respectivamente após 45 dias de cultivo. Neste sentido, concentrações muito baixas de TDZ podem não fornecer estímulo suficiente para gerar respostas ideais (AHMED; ANIS; AL-ETTA, 2014), enquanto que a maior exposição ao TDZ pode ter efeitos adversos (AHMAD; ANIS, 2007). A utilização de TDZ *in vitro*, pode ser útil para multiplicação em larga escala, pois este é um dos reguladores vegetais mais eficazes (KHANAM; ANIS, 2018).

#### Alongamento, enraizamento e aclimatização

Para o alongamento e enraizamento das brotações, o meio de cultura MS isento de fitorreguladores proporcionou um valor médio de comprimento das plântulas (cm) de 6,37 e quanto ao enraizamento, a média observada foi de 95% de plantas enraizadas após 28 dias de cultivo. Após o período de 28 dias de aclimatização em casa-de-vegetação, 85 % das plantas sobreviveram. O tamanho médio da parte aérea das plantas foi de 15.80 cm e não foram observadas alterações fenotípicas.

#### **CONCLUSÕES**

O protocolo utilizado foi eficiente para a introdução *in vitro* e regeneração de plantas de *Ocimum basilicum* L. a partir de explantes foliares. O regulador TDZ demonstrou eficiência na indução de calos e regeneração de brotos e o substrato composto por vermiculita, casca de arroz carbonizada e o substrato composto por vermiculita, casca de arroz carbonizada e substrato Plantmax<sup>®</sup> na proporção 1:1:1 apresentou-se adequado para a aclimatização das mudas produzidas *in vitro*.

#### **REFERÊNCIAS**

AHMAD, N.; ANIS, M. Rapid clonal multiplication of a woody tree, *Vitex negundo* L. through axillary shoots proliferation. **Agroforestry Systems**, v. 71, n. 3, p. 195–200, 2007.

AHMED, M. R.; ANIS, M.; AL-ETTA, H. A. An Efficient *In Vitro* Process for Cyclic Clonal Production of Shoots from Adult Tree of *Cassia alata* L. and Evaluation of Genetic Stability Using DNA-Based Markers. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 174, n. 8, p. 2886–2896, 1 dez. 2014.

ARRUDA, E. S.; OLIVEIRA, W.P.; CONCEIÇÃO, C.A.; FEIDEN, A.; BORSATO, A.V.; JORGE, M.H.A.; CONCEIÇÃO, V.; XAVIER, R.M. Teste de germinação de sementes de manjeriço inoculadas com microrganismos diferentes (EM). **Cadernos de Agroecologia**. v 7, n.2, 2012.

DESCHAMPS, C.; SIMON, J. Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of *Ocimum basilicum* and *O. citriodorum*. **Plant Cell Rep**, v. 21, p. 359-364, 2002.



KHANAM, M. N.; ANIS, M. Organogenesis and efficient in vitro plantlet regeneration from nodal segments of *Allamanda cathartica* L. using TDZ and ultrasound assisted extraction of quercetin. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 134, n. 2, p. 241–250, 2018.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plantarum**, v.15, n.3, p.473-479. 1962.

NAVET, N.; TIAN, M. Efficient targeted mutagenesis in allotetraploid sweet basil by CRISPR/Cas9. **Plant Direct**, v.4, n. 6, 2020.

NAVET, N.; TIAN, M. Agrobacterium-mediated Transformation of Sweet Basil (*Ocimum basilicum*). **Bio-protocol**. v. 10, n. 22, 2020.

RIBEIRO, F, M.; DONINI, L.P.; SOUZA, J.A.; GUISSO, A.P.; MOURA, I.F.; BOBROWSKI, V.L.; VIÉGAS, J. Influência de Diferentes Concentrações de Sais de MS e Açúcares no Cultivo In Vitro de Manjeriçã Roxo (*Ocimum basilicum* L.). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. 2, p. 57-59, 2007.