

Micropropagação de babosa (*Aloe vera* L.)

DEBIASI, C.^{1,2*}; SILVA, C.G.¹; PESCADOR, R.¹

¹FURB - Fundação Universidade Regional de Blumenau, Blumenau-SC, 89010-971; ²Doutorando em Agronomia, bolsista CNPq. UNESP - Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP, 18610-307. *Autor correspondente (debiasi@fca.unesp.br)

RESUMO: A demanda por mudas de alta qualidade genética e fitossanitária de espécies medicinais é crescente. A babosa (*Aloe vera* L.) é propagada convencionalmente através do desbrote lateral, o que torna a prática morosa, cara e de baixo rendimento. Assim, o objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de um protocolo de micropropagação de *A. vera*. Para tanto, ápices meristemáticos de *A. vera* foram submetidos a testes de assepsia, variando tempo de imersão nas soluções de hipoclorito de sódio (40% do produto comercial) e de álcool (70%) e em seguida submetidos à multiplicação *in vitro* sob efeito de combinações e concentrações dos reguladores vegetais BA (6-Benzilaminapurina), KIN (Cinetina), IAA (ácido-Indolil-3- acético) e NAA (ácido-Naftaleno-acético) suplementados no meio de cultura MS durante 180 dias (6 subcultivos). Para o estabelecimento inicial, o melhor tratamento fitossanitário foi a imersão dos ápices meristemáticos por 20 minutos em solução de hipoclorito de sódio 40% + 01 minuto em solução de álcool 70%, repetindo-se a sequência na bancada e em seguida na câmara de fluxo laminar. Em relação à multiplicação *in vitro*, os melhores resultados foram a utilização do meio de cultura MS isento de reguladores vegetais no primeiro subcultivo (30 dias), suplementação com 2,85 mmol L⁻¹ de IAA 4,44mmolL⁻¹ de BA no segundo subcultivo (60 dias), 2,85 mmol L⁻¹ de IAA+ 8,88 mmol L⁻¹ de BA no terceiro subcultivo (90 dias), 2,85 mmol L⁻¹ de IAA+22,2 mmol L⁻¹ de BA no quarto subcultivo (120 dias), 4,44 mmol L⁻¹ de BA no quinto subcultivo (150 dias) e novamente retirando os reguladores vegetais no sexto subcultivo (180 dias), atingindo-se uma média de 201 novas mudas de *A. vera* num período de 6 meses.

Palavras-chave: Reguladores vegetais, clonagem *in vitro*, plantas medicinais, *Aloe*, propagação

ABSTRACT: Micropropagation of *Aloe vera* L. The demand for high genetic and fit sanitary quality plantlets of medicinal plants is increasing. The babosa (*Aloe vera* L.) is propagated conventionally through lateral buds, which is a slowly, very expensive and low income practice. Thus, the objective of this work was the development of *A. vera* micropropagation protocol. Meristems of *A. vera* were submitted to asepsis tests, varying the time of immersion in 3% NaOCl solution, 70% alcohol solution and after were submitted *in vitro* multiplication with effect of combinations and concentrations of vegetal regulators BA (6-Benzylaminopurine), KIN (Kinetin), IAA (Indole-3-acetic acid) and NAA (á Naphthyl acetic acid) supplemented in the MS media culture during 180 days (6 subcultures). For the initial establishment, the best disinfection treatment was the meristem immersion for 20 minutes in 3% NaOCl solution + 1 minute in 70% alcohol solution, repeating that sequence in the board and after in the laminar flow. In relation to *in vitro* multiplication, the best results were the use of MS media culture with out vegetal regulators in the first subculture (30 days), supplemented with 2.85 mmol L⁻¹ of IAA + 4.44 mmol L⁻¹ of BA in the second subculture (60 days), 2.85 mmol L⁻¹ of IAA+ 8.88 mmol L⁻¹ of BA in the third subculture (90 days), 2.85 mmol L⁻¹ of IAA+22.2 mmol L⁻¹ of BA in the fourth subculture (120 days), 4.44 mmol/L of BA in the fifth subculture (150 days) and again removing the vegetal regulators in the sixth subculture (180 days), reaching an average of 201 new plantlets of *A. vera* in a period of 6 months.

Key words: Plant growth regulator, *In vitro* cloning, medicinal plants, *Aloe*, propagation.

INTRODUÇÃO

Aloe vera L. (babosa), nome dado por Carl Von Linne em 1720, sendo posteriormente referida como *Aloe barbadensis* Miller, é uma planta pertencente à família Liliaceae que tem origem na região noroeste africana e ocorrência em regiões subtropicais e tropicais. Trata-se de uma planta medicinal com registros de sua utilização, pelos povos do Mediterrâneo, remontas ao ano de 400 a.C. (Araujo et al., 2002).

A importância medicinal desta espécie, de acordo com Langmead et al. (2004), está no fato de terem sido descritos 70 diferentes compostos biologicamente ativos, atribuindo a ela propriedades antioxidantes, antiinflamatórias, anticarcinogênicas, antidiabéticas, imunostimulantes, dentre outras.

Dado ao fato de possuir inúmeras aplicações, nos mais variados segmentos das indústrias farmacêuticas, de cosméticos, alimentos e de ornamentação, a demanda por matéria-prima desta espécie, com alta qualidade, é crescente e o aumento da oferta requer expansão significativa nas áreas de cultivo. No Brasil, esta espécie vem sendo cultivada principalmente em propriedades de pequeno e médio porte do sudeste e sul do país, com

perspectivas de expansão para outras regiões.

O início do processo de cultivo da *A. vera* passa pela obtenção de mudas, que convencionalmente é realizado por divisão de brotos laterais, com média de 4 brotos/ano/planta, o que torna a prática de baixo rendimento, morosa e cara, além de não garantir qualidade às mudas.

Neste sentido, iniciar o estabelecimento de um protocolo de propagação massal de *A. vera*, utilizando técnicas biotecnológicas de micropropagação de plantas, poderá auxiliar na resolução desta problemática, uma vez que possibilitará a produção de um elevado número de clones com qualidade genética e fitossanitária, num curto espaço de tempo.

MATERIAL E MÉTODO

Assepsia e estabelecimento inicial

Ápices meristemáticos com 0,5 a 1,0 cm de tamanho foram isolados de brotações laterais de *A. vera*, cultivadas em campo, e imersos em soluções de hipoclorito de sódio (40% do produto comercial) e de álcool (70%) em diferentes tempos de imersão, formando os tratamentos conforme apresentado na Tabela 1.

TABELA 1. Tempos de imersão dos ápices meristemáticos de *A. vera* em soluções de hipoclorito de sódio (40% do produto comercial) e de álcool (70%) durante o processo de assepsia inicial para o estabelecimento *in vitro*.

Tratamentos	Na Bancada			Na Câmara de fluxo laminar		
	Hipoclorito de sódio 40%	Álcool 70%	3 enxágues H ₂ O Esterilizada	Hipoclorito de sódio 40%	Álcool 70%	3 enxágues H ₂ O esterilizada
T1	-	-	X	-	-	X
T2	5 minutos	-	X	5 minutos	-	X
T3	10 minutos	1 minuto	X	10 minutos	1 minuto	X
T4	20 minutos	1 minuto	X	20 minutos	1 minuto	X

Após a assepsia, em câmara de fluxo laminar, os ápices meristemáticos foram inoculados em tubos de ensaio contendo meio de cultura MS (Murashige & Skooge, 1962), suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 7 g L⁻¹ de agar-agar e pH ajustado para 5,8 antes da esterilização em autoclave a temperatura de 120°C, 1,5 atm de pressão de vapor durante 20 minutos. Em seguida as culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C, fotoperíodo diário de 16 horas de luz (50 µmol m⁻² s⁻¹) e 8 horas de escuro, durante 60 dias.

Multiplicação massal

Ápices meristemáticos com 0,5 cm de tamanho, oriundos de microplantas estabelecidas *in vitro* conforme descritos no item 2.1, foram cultivados

em meios de cultura MS (Murashige & Skooge, 1962), suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 7 g L⁻¹ de agar-agar, além dos reguladores vegetais BA (6-Benzilaminapurina), KIN (Cinetina), IAA (ácido-Indolil-3- acético) e NAA (ácido-Naftaleno-acético) em diferentes concentrações e combinações, formando os tratamentos apresentados na Tabela 2.

Após a inoculação, as culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2°C, 16 horas de luz (50 µmol m⁻² s⁻¹) e 8 horas de escuro/dia, sendo subcultivadas 6 vezes nos mesmos meios de cultura (Tabela 2), em intervalos de 30 dias cada, totalizando 180 dias de cultivo *in vitro*.

TABELA 2. Suplementação do meio de cultura MS com os reguladores vegetais BA (6-Benzilaminapurina), KIN (Cinetina), IAA (ácido-Indolil-3- acético) e NAA (ácido-Naftaleno-acético) para multiplicação massal de ápices meristemáticos de *A. vera in vitro*.

Tratamentos	BA ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	KIN ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	IAA ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	NAA ($\mu\text{mol L}^{-1}$)
T1	-	-	-	-
T2	4,44	-	-	-
T3	8,88	-	-	-
T4	22,2	-	-	-
T5	4,44	-	2,85	-
T6	8,88	-	2,85	-
T7	22,2	-	2,85	-
T8	4,44	-	-	2,68
T9	8,88	-	-	2,68
T10	22,2	-	-	2,68
T11	-	4,65	-	-
T12	-	9,3	-	-
T13	-	23,25	-	-
T14	-	4,65	2,85	-
T15	-	9,3	2,85	-
T16	-	23,25	2,85	-
T17	-	4,65	-	2,68
T18	-	9,3	-	2,68
T19	-	23,25	-	2,68

Desenho experimental e avaliações

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, contendo 19 tratamentos e 14 repetições, sendo cada repetição representada por um explante do tipo ápice meristemático. Os resultados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e teste de separação de médias (TUKEY 5%).

As características biométricas avaliadas foram porcentagem de explantes sem contaminação e porcentagem de explantes contaminados por fungos e/ou bactérias para a etapa 2.1. (Assepsia e estabelecimento inicial) e o número médio de brotos emitidos e altura média dos brotos para a etapa 2.2. (multiplicação massal) em cada um dos 6 subcultivos.

RESULTADO E DISCUSSÃO

Assepsia e estabelecimento inicial

O aumento do tempo de imersão dos explantes de *A. vera* nas soluções assépticas de hipoclorito de sódio e de álcool foram fundamentais para a eliminação dos agentes de contaminação (fungos e bactérias) e conseqüentemente, obtenção de sucesso no estabelecimento inicial *in vitro* desta espécie (Figura 1).

Após 60 dias de cultivo *in vitro*, o melhor tratamento fitossanitário foi a imersão dos ápices meristemáticos por 20 minutos em solução de hipoclorito de sódio 40% e 01 minuto em solução de álcool 70%, repetindo-se a seqüência na bancada e

em seguida na câmara de fluxo laminar (tratamento T4), impedindo a contaminação em 93,33% dos explantes inoculados. A não imersão dos explantes nas soluções assépticas (tratamento T1) resultou em 100% de morte por contaminação fúngica e bacteriana.

Segundo Leifert et al. (1991), as condições fitossanitárias da planta matriz determinam a eficiência do processo de desinfecção dos explantes antes do seu estabelecimento *in vitro*. Assim podemos supor que as plantas matrizes doadoras de explantes para este trabalho, mesmo sendo cultivadas em condições de campo, apresentaram estado fitossanitário compatível com o sucesso no estabelecimento inicial *in vitro* de material vegetal isento de contaminação.

Segundo Debiassi et al. (2004), é usual a utilização do hipoclorito de sódio, nas mais variadas concentrações, como forma de assepsia e em processos de biotecnologia vegetal, as soluções de hipoclorito de sódio são amplamente empregadas nos processos assépticos das fontes de explante para o estabelecimento inicial *in vitro* de uma série de espécies.

Neste trabalho, em média, a proporção de contaminação fúngica nos explantes foi 23,81% superior à bacteriana, nos tratamentos em que os dois tipos foram observados (T1, T2 e T3).

Trabalhando com *Zingiber officinale*, Debiassi et al. (2004) relataram que a presença de contaminantes do tipo fungos foi sempre superior à de bactérias, no processo de estabelecimento inicial *in vitro*, de gemas rizomatosas desta espécie.

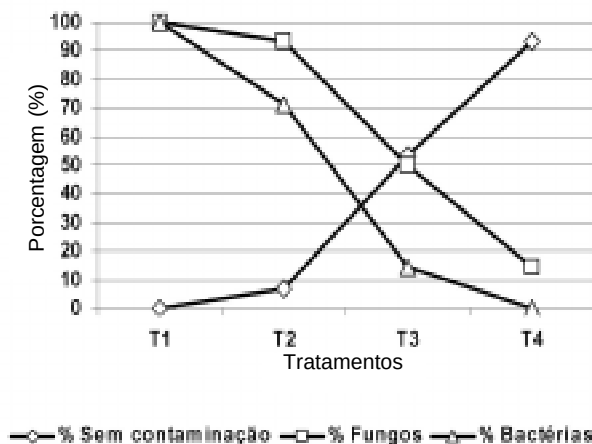


FIGURA 1. Porcentagem de explantes de *A. vera* sem contaminação e contaminados por fungos e bactérias após tratamentos assépticos: T1 (sem assepsia), T2 (5' hipoclorito de sódio 40%), T3 (10' hipoclorito de sódio 40%+1' álcool 70%) e T4 (20' hipoclorito de sódio+ 1' álcool 70%). (N=14)

Abrie & Van Standen (2001) adotaram uma metodologia diferente de estabelecimento *in vitro* de uma espécie de *Aloe*. Estes autores descontaminaram sementes de *A. polyphylla* por intermédio da escarificação, imersão por 2 minutos em etanol, enxágüe de 10 minutos em NaOCl e lavagem em água esterilizada, conseguindo 100% de sucesso na limpeza fúngica e bacteriana, porém foram observados sérios problemas de oxidação e vitrificação das plântulas. Além disso, este método não garante a identidade genética de qualidade, quando se pensa em fixação de características específicas por intermédio dos clones, obtidos apenas por propagação vegetativa, incluindo a micropropagação, por utilizar sementes e assim ocorrer recombinação gênica.

Em alguns casos, o processo de assepsia adotado exige especificidades, variando conforme o tipo de contaminantes presentes. Assim Aggarwal & Barna (2004), só conseguiram estabelecer brotos laterais de *A. vera in vitro*, após submetê-los a uma limpeza em água corrente por 30 minutos, imersão em solução de Bavistin 1% por 1 hora e em solução de Savlon por 2 minutos, seguido de um enxágüe em água esterilizada, imersão em solução de álcool 70% por 30 segundos e em solução de cloreto de mercúrio 0,1% por 5 minutos, antes da inoculação.

Multiplicação massal

A utilização ou não de reguladores vegetais suplementados ao meio de cultura MS, influenciou diretamente os padrões morfogenéticos *in vitro* de *A. vera*, no que diz respeito ao tamanho e potencial

proliferativo dos explantes. Na Tabela 3 estão apresentados os resultados referentes ao número médio de brotos obtidos por explante nos 6 subcultivos (180 dias de cultivo *in vitro*).

A variação nas respostas dos explantes de *A. vera* à ação dos reguladores vegetais demonstra a sensibilidade celular. Assim, o comportamento dos explantes foi diferente ao longo dos 6 subcultivos, onde os reguladores vegetais estimularam e/ou inibiram os processos de diferenciação e crescimento (Figura 2). Estes resultados reforçam a teoria de que as células vegetais possuem a capacidade de responder a estímulos químicos e físicos, aos quais forem submetidos, com variações entre espécies, clones de uma mesma espécie e também ao longo do tempo e/ou do número de subcultivos *in vitro* (George, 1996).

Assim, no primeiro subcultivo (30 dias), a não suplementação do meio de cultura com reguladores vegetais (Tratamento T1) levou à formação do maior número médio de novos brotos emitidos por explante inicial (2,46 brotos). Pode-se supor, neste caso, que os explantes possuíam níveis hormonais endógenos suficientes para se diferenciarem e desenvolverem brotos e que esta capacidade foi mais eficiente que a adquirida quando da suplementação do meio de cultura com regulador vegetal. Assim, estas substâncias poderiam levar a níveis que inibissem o desenvolvimento dos brotos (Tratamento T1).

A formação de gemas laterais é um processo de organogênese direta comandado pela dominância apical na presença de um balanço Auxinas/Citocininas favorável aos teores de Citocininas (Taiz & Zeiger, 2004). Segundo Debiasi (2000), aspectos relacionados ao controle do desenvolvimento de gemas vem sendo amplamente estudados e relatados nos últimos anos, enfatizando o efeito dos reguladores vegetais, da luz, da vascularização e dos nutrientes minerais. A interação destes fatores poderia ser a causa das diferenças apresentadas nos explantes em relação à capacidade de multiplicação e desenvolvimento dos ápices meristemáticos de *A. vera* mostrados neste trabalho.

Já no 2º (60 dias), 3º (90 dias), 4º (120 dias) e 5º (150 dias) subcultivos, a presença de reguladores vegetais foi importante para a manutenção ou aumento nas taxas de proliferação *in vitro* de *A. vera* na maioria dos tratamentos e nestes casos, atuaram mais como promotores do desenvolvimento e crescimento de brotações laterais.

No 2º subcultivo (60 dias) o tratamento T5 (2,85 mmol L⁻¹ de IAA + 4,44 mmol L⁻¹ de BA) permitiu a formação do maior número médio de brotos por explante inoculado (2,57). No 3º subcultivo (90 dias) foi o tratamento T6 (2,85 mmol L⁻¹ de IAA + 8,88 mmol L⁻¹ de BA) que permitiu a formação da maior média

TABELA 3. Número médio de novos brotos micropropagados de *A. vera*, produzidos por explante ao longo dos 6 subcultivos, conforme suplementação diferencial do meio de cultura MS.

Trat.	1 ^o subcultivo 30 dias	2 ^o subcultivo 60 dias	3 ^o subcultivo 90 dias	4 ^o subcultivo 120 dias	5 ^o subcultivo 150 dias	6 ^o subcultivo 180 dias
	Nº de brotos	Nº de brotos	Nº de brotos	Nº de brotos	Nº de brotos	Nº de brotos
T1	2,46 a	1,09 c	1,00 c	1,00 d	1,08 cd	1,62 a
T2	1,72 abode	1,46abc	1,64 abc	1,14 d	2,50 a	1,09 ab
T3	1,17 def	1,61 abc	2,28 ab	2,64 abc	1,50 abc	1,27 ab
T4	1,24 def	2,24 abc	1,71 abc	2,28 abcd	1,00 cd	1,11 ab
T5	1,63 abedef	2,57 a	1,64 abc	2,00 abcd	2,14 abc	1,00 b
T6	1,31 def	2,23 abc	2,35 a	1,78 bcd	2,29 ab	1,00 b
T7	0,86 f	2,48 ab	1,21 bc	3,35 a	1,38 abc	1,27 ab
T8	1,59 bodef	2,05 abc	2,00 abc	1,28 cd	2,02 abc	1,36 ab
T9	1,46 beef	2,18 abc	1,64 abc	1,71 bcd	1,23 bc	1,12 ab
T10	1,43 bodef	1,92 abc	1,14 c	2,85 ab	1,92 abc	1,00 b
T11	1,83 abcd	1,00 c	1,16 c	1,00 d	1,50 abc	1,37 ab
T12	2,21 abc	1,14 c	1,55 abc	1,78 bcd	1,33 abc	1,00 b
T13	1,58 bodef	1,00 c	1,00 c	1,92 bcd	1,16 bcd	1,00 b
T14	2,28 ab	1,85 abc	1,20 bc	1,14 d	1,11 bcd	1,00 b
T15	2,27 ab	1,21 bc	1,16 c	1,00 d	1,23 bc	1,32 ab
T16	1,41 cdef	1,85 abc	1,41 abc	1,92 bcd	1,18 bcd	1,23 ab
T17	1,28 def	1,00c	1,12 c	1,85 bcd	1,23 bc	1,00 b
T18	0,95 ef	1,00 c	1,00 c	1,07 d	1,00 cd	1,00 b
T19	1,16 def	1,28 bc	1,40 abc	1,00 d	0,00 d	0,00 c

TRATAMENTOS: T1(isento de reguladores vegetais); T2(4,44 mmol L⁻¹ de BA); T3(8,88 mmol L⁻¹ de BA); T4(MS+22,2 mmol L⁻¹ de BA); T5(2,85 mmol L⁻¹ de IAA 4,44 mmol L⁻¹ de BA); T6(2,85 mol L⁻¹ de IAA+ 8,88 mmol L⁻¹ de BA); T7(2,85 mmol L⁻¹ de IAA+22,2 mmol L⁻¹ de BA); T8(2,68 mmol L⁻¹ de NAA+4,44 mmol L⁻¹ de BA); T9(2,68 mol L⁻¹ de NAA+8,88 mmol L⁻¹ de BA); T10(2,68 mmol L⁻¹ de NAA+22,2 mmol L⁻¹); T11(4,65 mmol L⁻¹ de KIN); T12(9,3 mmol L⁻¹ de KIN); T13(23,25 mol L⁻¹ de KIN); T14(2,85 mmol L⁻¹ de NAA+ 4,65 mmol L⁻¹ de KIN); T15(2,85 mmol L⁻¹ de NAA+ 9,3 mmol L⁻¹ de KIN); T16(2,85 mmol L⁻¹ de IAA+ 9,3 mmol L⁻¹ de KIN); T17(2,68 mmol L⁻¹ de NAA + 4,65 mmol L⁻¹ de KIN); T18(2,68 mmol L⁻¹ de NAA + 9,3 mmol L⁻¹ de KIN); T19(2,68 mmol L⁻¹ de NAA + 23,25 mmol L⁻¹ de KIN). Letras diferentes na vertical indicam significância estatística pelo teste TUKEY 5%. (N=14).

(2,35 brotos). Já no 4^o subcultivo (120 dias), 3,35 novos brotos foram obtidos com a suplementação do meio de cultura MS com 2,85 mmol L⁻¹ de IAA + 22,2mmol L⁻¹ de BA (Tratamento T7), enquanto que 4,44 mol L⁻¹ de BA (Tratamento T2) foi suficiente para produzir 2,5 novos brotos de média aos 150 dias de cultivo (5^o subcultivo).

Nota-se que para atingir as maiores médias de novos brotos emitidos entre o 2^o e 4^o subcultivos (60 e 90 dias, respectivamente), foi necessário um aumento na concentração da citocinina (BA) no meio de cultura, sempre associada com IAA. Observou-se ainda que BA foi o regulador vegetal, da classe das Citocininas, que em geral apresentou os melhores resultados neste trabalho, por superar aqueles obtidos com a utilização da KIN como fonte de Citocinina no meio de cultura.

A adição de Citocininas ao meio de cultura parece ser favorável e indispensável para a quebra da dominância apical e indução de proliferação de gemas axilares em uma série de espécies cultivadas *in vitro*.

De acordo com Bonga & Durzan (1985), BA é a Citocinina mais potente para promover a proliferação de partes aéreas e a razão maior da eficiência pode estar na capacidade dos tecidos vegetais de metabolizarem os hormônios naturais mais rapidamente do que reguladores sintéticos, porém algumas espécies podem responder melhor a outras Citocininas.

Em trabalhos *in vitro* com *Aloe*, as Citocininas são freqüentemente estudadas e BA a mais utilizada. Aggarwal & Barna (2004), suplementando o meio de cultura MS com 1,0 mg L⁻¹ de BA, conseguiram média de 3,3 novos brotos de *A. vera* a cada 30 dias de cultivo *in vitro*, assim como Abrie & Standen (2001) relataram que a utilização de 1,0 mg L⁻¹ de BA promoveu a maior produção de novos brotos de *A. polyphylla* cultivados *in vitro*. Já Liao et al. (2004), trabalhando com *A. vera* var. *chinensis*, protocolaram o meio de cultura MS suplementado com 2,0 mg L⁻¹ de BA, 0,3 mg L⁻¹ de NAA, 30 g L⁻¹ de sacarose e 0,6 g L⁻¹ de PVP como sendo o mais

eficiente na indução proliferativa de brotos *in vitro*. Trabalhando com 16 diferentes genótipos *in vitro* de *A. vera*, Araujo et al. (2002) avaliaram o potencial proliferativo em meio de cultura MS suplementado com 6,67 mmol L⁻¹ de BA e 4,03 mmol L⁻¹ de NAA e obtiveram média geral de 2 novos brotos, destacando superioridade de 2 genótipos oriundos do Paraguai, os quais apresentaram médias de 6 e 8 novos brotos formados por explante, após 45 dias de cultivo. Chukwujekwu et al. (2002), estudando o efeito de diferentes Citocininas na micropropagação de *A. polyphylla*, concluíram as melhores concentrações como sendo 0,5 mg L⁻¹ de Zeatina, 1,5 mg L⁻¹ de KIN ou 1,5 mg L⁻¹ de BA.

Já no 5º subcultivo (150 dias), o tratamento

T2 (4,44 mmol L⁻¹ de BA) favoreceu a maior produção de novos brotos emitidos, cuja média foi de 2,5, enquanto que no 6º subcultivo (180 dias), o maior número de novos brotos foi emitido nos explantes cultivados no meio de cultura isento de reguladores vegetais (Tratamento T1), média de 1,62.

A mudança na necessidade de suplementação do meio de cultura com reguladores vegetais nos últimos subcultivos, com vistas em manter elevada a proliferação, mostra mais acentuadamente a probabilidade de haver variação na sensibilidade que as células possuem em responderem aos estímulos que lhe são dados *in vitro*, uma vez que as respostas podem ser favoráveis ou contrárias, conforme resultados obtidos ao longo deste trabalho.

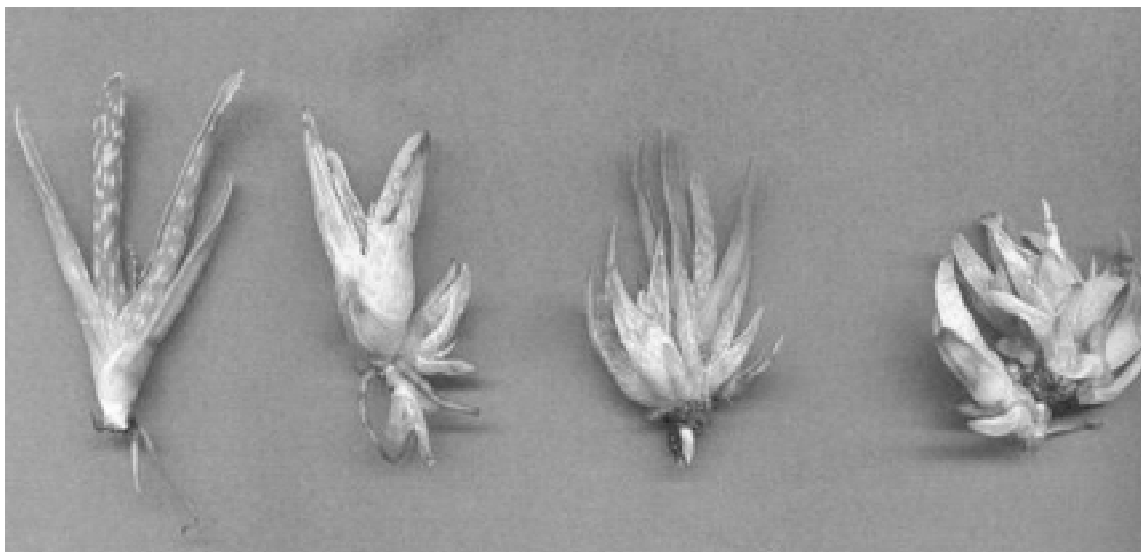


FIGURA 2. Padrões comportamentais de desenvolvimento morfogênético *in vitro* de *A. vera*. (Foto: Debiasi, 2004).

A sacarose também parece afetar diretamente o comportamento de *Aloe* quando cultivada *in vitro*. Liao et al. (2004), testaram diferentes concentrações de sacarose (20, 30 e 40 g L⁻¹) no meio de cultura MS e avaliaram o efeito sobre o comportamento de *A. vera* var. *chinensis*. Os autores observaram que 30 g L⁻¹ de sacarose foi a mais adequada na multiplicação de brotações adventícias e relataram ainda que a variação na concentração de sacarose no meio de cultura, teve maior efeito na formação de brotações adventícias quando comparado com explantes que foram submetidos à variação nas concentrações dos reguladores vegetais BA e NAA. Por outro lado, Abriel & Van Staden (2001) relataram que o cultivo *in vitro* de *A. polyphylla* em meio de cultura com baixas concentrações de sacarose proporciona redução na oxidação dos explantes e Chukwujekwu et al. (2002) indicam 30 g L⁻¹ como sendo a melhor concentração de sacarose para a micropropagação da mesma espécie.

Um fato associado à utilização de BA no cultivo *in vitro* de *Aloe* é o aparecimento de necroses nos explantes iniciais. Segundo Abriel & Van Staden (2001), a necrose é um dos principais fatores que limitam o estabelecimento de cultura de tecidos de espécies de *Aloe*. Todavia, necroses de explantes no estabelecimento das culturas *in vitro* não foram observadas no presente trabalho, uma vez que os ápices meristemáticos estabelecidos, conforme descrito no item 2.1, desenvolveram-se normalmente.

Já Natali et al. (1990) reportaram que o uso de BA causou necrose dos explantes de *A. barbadensis*, comprometendo significativamente o estabelecimento inicial dos explantes *in vitro*. Meyer & Van Staden (1991) e Natali et al. (1990) atribuíram ao BA, KIN e IAA, associados ou não ao 2,4-D o aumento na oxidação *in vitro* de explantes de *A. barbadensis*.

Para evitar necroses nos materiais vegetais *in vitro*, vários são os relatos de utilização de

antioxidantes no meio de cultura, como por exemplo o PVP (polivinilpirrolidona-60) na micropropagação de *A. vera* var. *chinensis* (Liao et al., 2004) e *A. polyphylla* (Abrie & VanStaden, 2001), e do ácido ascórbico também na micropropagação da *A. polyphylla* (Abrie & Staden, 2001) e *A. vera* (Roy & Sarkar, 1991).

A vitrificação *in vitro* das microplantas também tem sido um dos problemas apresentados em algumas espécies de *Aloe*. Porém no presente trabalho, *A. vera* não apresentou indícios de vitrificação dos tecidos aos longo dos 6 subcultivos em nenhum dos tratamentos estudados.

Abrie & Van Staden (2001) em seus trabalhos *in vitro* com *A. polyphylla* verificaram que com o incremento na concentração de BA, aumentava-se não só o número de brotos e níveis de oxidação dos tecidos, mais também a vitrificação das microplantas. Chukwujekwu et al. (2002) relatam que a suplementação do meio de cultura MS com BA (1,0-3,0 mg L⁻¹), na multiplicação *in vitro* de *A. polyphylla*, causou vitrificação na maioria das microplantas.

Em relação à altura média dos brotos, com resultados apresentados na Tabela 4, observamos variação no comportamento *in vitro* de *A. vera* ao longo dos subcultivos. Em 3, dos 6 subcultivos, verificou-se que a não suplementação do meio de cultura MS com reguladores vegetais (Tratamento T1), proporcionou o melhor desenvolvimento em altura dos

novos brotos emitidos, ou seja, no primeiro subcultivo (30 dias) obteve-se a média de 2,11 cm, no terceiro subcultivo (90 dias) 1,81 cm e no quarto subcultivo (120 dias) 2,46 cm de altura.

Debiasi (2000) em observações realizadas na micropropagação da bananeira, relatou que a altura média das brotações é inversamente proporcional à taxa proliferativa, ou seja, quanto maior a altura média, menor o número médio de brotos formados. Este fato não foi observado neste trabalho, uma vez que esta relação entre maior altura e menor número de brotos emitidos não ocorreu durante a micropropagação de *A. vera*, nas condições do experimento.

Nos demais subcultivos, segundo (60 dias), quinto (150 dias) e sexto (180 dias), os tratamentos que propiciaram maior desenvolvimento em altura foram T17 (2,68 mmol L⁻¹ de NAA + 4,65 mmol L⁻¹ de KIN) com 2,24 cm, T9 (2,68 mmol L⁻¹ de NAA+8,88 mmol L⁻¹ de BA) com 1,75 cm e T14 (2,85 mmol L⁻¹ de NAA+ 4,65 mmol L⁻¹ de KIN) com 3,06 cm de altura, respectivamente.

O tamanho das microplantas é um dos fatores importantes a ser considerado no processo de aclimação de mudas clonadas *in vitro*, uma vez que a adaptação destas às condições naturais de cultivo torna-se um evento estressante, o que pode causar uma perda expressiva no total produzido caso as plantas não estiverem bem desenvolvidas.

TABELA 4. Altura média dos brotos micropropagados de *A. vera*, ao longo dos 6 subcultivos, conforme suplementação diferencial do meio de cultura MS.

Trat.	1 ^o subcultivo 30 dias	2 ^o subcultivo 60 dias	3 ^o subcultivo 90 dias	4 ^o subcultivo 120 dias	5 ^o subcultivo 150 dias	6 ^o subcultivo 180 dias
	Altura (cm)	Altura (cm)	Altura (cm)	Altura (cm)	Altura (cm)	Altura (cm)
T1	2,11 a	2,08 abc	1,81 a	2,46 a	1,67 ab	1,55 bdef
T2	1,28 bode	1,35 abcd	1,35 abcd	1,72 abcd	1,31 abc	1,72 bodef
T3	1,27 bode	1,29 bcd	1,29 abcd	1,17 def	1,51 abc	1,16 def
T4	1,07 de	1,32 bcd	0,95 cd	1,24 def	1,24 abc	1,06 ef
T5	0,88 e	1,68 abc	1,08 bcd	1,63 abcdef	1,04 bc	1,16 def
T6	1,53 abode	1,24 cd	1,48 abcd	1,31 def	1,23 abc	1,54 bodef
T7	0,87 e	1,60 abcd	0,77 d	0,88 f	1,47 abc	1,18 def
T8	1,48 abode	1,90 abc	0,96 cd	1,59 bodef	1,33 abc	1,44 bodef
T9	1,23 bode	1,81 abc	1,23 abcd	1,46 bodef	1,75 a	1,31 cdef
T10	0,90 de	1,55 abcd	1,18 abcd	1,43 bodef	1,15 abc	1,00 f
T11	1,46 abode	2,18 ab	1,17 abcd	1,83 abcd	1,50 abc	1,85 bcd
T12	1,63 abcd	2,18 ab	1,90 a	2,21 abc	1,72 a	2,12 b
T13	1,35 bode	0,75 d	1,78 ab	1,58 bodef	1,34 abc	2,05 bc
T14	1,90 ab	1,37 abcd	1,39 abcd	2,28 ab	1,63 abc	3,06 a
T15	1,63 abc	1,59 abcd	1,49 abcd	2,27 ab	1,41 abc	1,79 bcde
T16	1,29 bode	1,44 abcd	1,61 abc	1,41 cdef	1,53 abc	2,16 b
T17	1,30 bode	2,24 a	1,68 abc	1,28 def	1,26 abc	2,10 b
T18	1,14 cde	0,72 d	1,00 cd	0,95 ef	1,00 c	1,20 def
T19	1,20 bode	1,89 abc	1,03 cd	1,16 def	0,00 d	0,00 g

TRATAMENTOS: T1(isento de reguladores vegetais); T2(4,44 mmol L⁻¹ de BA); T3(8,88 mmol L⁻¹ de BA); T4(MS+22,2 mmol L⁻¹ de BA); T5(2,85 mmol L⁻¹ de IAA 4,44 mmol L⁻¹ de BA); T6(2,85 mol L⁻¹ de IAA+ 8,88 mmol L⁻¹ de BA); T7(2,85 mmol L⁻¹ de IAA+22,2 mmol L⁻¹ de BA); T8(2,68 mmol L⁻¹ de NAA+4,44 mmol L⁻¹ de BA); T9(2,68 mol L⁻¹ de NAA+8,88 mmol L⁻¹ de BA); T10(2,68 mmol L⁻¹ de NAA+22,2 mmol L⁻¹); T11(4,65 mmol L⁻¹ de KIN); T12(9,3 mmol L⁻¹ de KIN); T13(23,25 mol L⁻¹ de KIN); T14(2,85 mmol L⁻¹ de NAA+ 4,65 mmol L⁻¹ de KIN); T15(2,85 mmol L⁻¹ de NAA+ 9,3 mmol L⁻¹ de KIN); T16(2,85 mmol L⁻¹ de IAA+ 9,3 mmol L⁻¹ de KIN); T17(2,68 mmol L⁻¹ de NAA + 4,65 mmol L⁻¹ de KIN); T18(2,68 mmol L⁻¹ de NAA + 9,3 mmol L⁻¹ de KIN); T19(2,68 mmol L⁻¹ de NAA + 23,25 mmol L⁻¹ de KIN). Letras diferentes na vertical indicam significância estatística pelo teste TUKEY 5%. (N=14).

Analisando os resultados obtidos neste trabalho, podemos visualizar uma aplicação concreta de um protocolo de propagação massal de mudas de *A. vera*, utilizando técnicas biotecnológicas apresentadas. Assim, para o estabelecimento inicial *in vitro*, deve-se empregar como tratamento fitossanitário dos ápices meristemáticos, imersão destes por 20 minutos em solução de hipoclorito de sódio 40% + 01 minuto em solução de álcool 70%, repetindo-se a seqüência na bancada e em seguida na câmara de fluxo laminar. Cultivar os ápices meristemáticos em meio de cultura MS isento de reguladores vegetais no primeiro subcultivo (30 dias), suplementando com 2,85 mmol L⁻¹ de IAA 4,44 mmol L⁻¹ de BA no segundo subcultivo (60 dias), 2,85 mmol L⁻¹ de IAA+ 8,88 mmol L⁻¹ de BA no terceiro subcultivo (90 dias), 2,85 mmol L⁻¹ de IAA+22,2 mmol L⁻¹ de BA no quarto subcultivo (120 dias), 4,44 mmol L⁻¹ de BA no quinto subcultivo (150 dias) e novamente retirando os reguladores vegetais no sexto subcultivo (180 dias), permite uma média de 201 novas mudas de *A. vera* L. num período de 6 meses. Prevendo a manutenção de uma média baseada nos 6 meses anteriores (2,47 novos brotos) e aplicando este valor para os próximos 6 meses (6 novos subcultivos), haveria um total de 45.643,37 mudas de *A. vera*. Este valor é muito superior aos obtidos pelos métodos convencionais de propagação para esta espécie, sem contar a superioridade genética obtida pela fixação de características desejadas de um indivíduo elite clonado, e ainda com a qualidade fitossanitária, pela isenção de pragas e doenças.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ABRIE A.L.; VAN STADEN, J. Micropropagation of the endangered *Aloe polyphylla*. **Plant Growth Regulation**, n.33, p.19-23, 2001.
 AGGARWAL, D.; BARNA, K.S. Tissue culture propagation of elite plant of *Aloe vera* Linn. **Journal Plant Biochemistry & Biotechnology**, v.13, p.77-9, 2004.

ARAUJO, P.S. et al. Micropropagação de Babosa (*Aloe vera* Liliaceae). **Biociência**, n.25, p.54-7, 2002.
 BONGA, J.M.; DURZAN, D.J. (Eds). **Tissue culture in forestry**. 2.ed. Dordrecht : Martinus Nijhoff Publishers, 1985. p.231-55.
 CHUKWUJEKWU, J.C.; FENNELL, C.W.; VAN STADEN, J. Optimisation of the tissue culture protocol for the endangered *Aloe polyphylla*. **South African Journal of Botany**, n.68, p.424-9, 2002.
 DEBIASI, C. **Efeitos de antiauxinas sobre a dominância apical em gemas de bananeira in vitro cvs. Grand naine (AAA), Nanicao (AAA) e Enxerto (AAB)**. 2000. 100p. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
 DEBIASI, C.; FELTRIN, F.; MICHELUZZI, F.C. Micropropagação de gengibre (*Zingiber officinale*). **Revista Brasileira de Agrociência**, v.10, n.1, p.65-70, 2004.
 GEORGE, E.F. **Plant Propagation by tissue culture. Part 1 and 2**. Edington: Exegetics, 1996.
 LANGMEAD, L.; MAKINS, R.J.; RAMPTON, D.S. Anti-inflammatory effects of *Aloe vera* gel in human colorectal mucosa *in vitro*. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, n.19, p.521-7, 2004.
 LEIFERT, C.; RITCHIE, J.Y.; WAITES, W.M. Contaminants of plant tissue and cell cultures. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.7, p.425-69, 1991.
 LIAO, Z. et al. Micropropagation of endangered Chinese aloe. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, n.76, p.83-6, 2004.
 MEYER, H.J.; VAN STADEN, J. Rapid *in vitro* propagation of *Aloe barbadensis* Mill. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, n.26, p.167-71, 1991.
 MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays if tobacco tissue cultures. **Physiology Plantarum**, n.15, p.473-97, 1962.
 NATALI, L.; SANCHEZ, I.C.; CAVALLINI, A. *In vitro* culture of *Aloe barbadensis* Mill.: Micropropagation from vegetative meristems. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, n.20, p.71-2, 1990.
 ROY, S.C.; SARKAR, A. *In vitro* regeneration and micropropagation of *Aloe vera* L. **Science Horticulture**, n.47, p.107-13, 1991.
 TAI, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. Redwood City: The Benjamin/Cummings, 2004. 556p.