

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIA AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRARIAS

MICROPROPAGAÇÃO DE BABOSA (*Aloe vera* L.)

CANDICE FERREIRA DE BRITO

CRUZ DAS ALMAS - BAHIA
FEVEREIRO – 2007

MICROPROPAGAÇÃO DE BABOSA (*Aloe vera* L.)

CANDICE FERREIRA DE BRITO

Engenheira Agrônoma
Escola de Agronomia da Universidade Federal da Bahia, 2002

Dissertação submetida à Câmara de Ensino de Pós-Graduação e Pesquisa da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Agrárias, Área de Concentração: Fitotecnia.

Orientador: Prof.º Dr. Weliton Antonio Bastos de Almeida

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRARIAS
CRUZ DAS ALMAS - BAHIA – 2007**

FICHA CATALOGRÁFICA

B 752 Brito, Candice Ferreira de

Micropropagação da babosa (*Aloe vera* L.) / Candice Ferreira de Brito - Cruz das Almas, BA, 2007.

43f.: il., tab.

Orientador: Weliton Antonio Bastos de Almeida

Dissertação (Mestrado) - Escola de Agronomia. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2007.

1. Cultivo *in vitro* 2. Regulador de crescimento 3. Plantas medicinais I. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas II. Título.

CDD 20. ed. 752.4

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof.º Dr. Weliton Antonio Bastos de Almeida
Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas - UFRB
(Orientador)

Prof.ª Drª. Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa
Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas - UFRB

Dr. Robson Rui Cotrim Duete
Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola - EBDA

Dissertação homologada pelo Colegiado do programa de pós-graduação em
Ciências agrárias em.....
Conferindo o Grau de Mestre em Ciências Agrárias em.....

Ao meu filho
Caique Brito Damasceno.

DEDICO

Aos meus pais Carlos Alberto e Vera
Lúcia, aos meus irmãos Ingrid e Claus, e
ao meu querido sobrinho Kenzo.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A DEUS energia eterna e absoluta.

Ao meu filho Caique motivo de minha inspiração e força de vontade.

Aos meus pais Bell e Vera, e meu sobrinho Kenzo pessoas fundamentais em minha vida.

Ao Prof^o. Weliton Antonio Bastos de Almeida pela orientação, amizade, pelos ensinamentos, confiança, admiração e respeito.

A Prof^a. Maria Angélica pelo apoio, amizade.

Ao Prof^o. Carlos Alfredo Lopes de Carvalho pelo incansável incentivo e exemplo de profissionalismo.

A prof^a. Ana Cristina Fermino pelo apoio e incentivo.

Ao Prof^o. Manoel Teixeira pelo apoio e auxílio na tradução dos resumos.

A Ana Paula minha irmã de alma por ter me ajudado, me ensinando e aturando por todo esse tempo.

A Márcio Gil um amigo que fiz para a vida toda e que me deu todo apoio que precisei.

A todos os colegas de mestrado. E em especial à Gean Capinan, Zuzinaide, Maria Alice, Arnaldo, Tâmara, Augusto, Edivânia, Lauro, Leônidas e Geógenes pela amizade.

Aos colegas de laboratório Elma, Josy, Nero e Fabíola pela ajuda nos trabalhos.

A Juliana, Taty, Ana, Karina amigas queridas que sempre estiveram ao meu lado.

Aos meus familiares, tios, primos e avós.

Aos funcionários Sidinha e Til pela dedicação.

Aos funcionários da UFRB. Em especial Sr^o. Crispim pela ajuda no laboratório e a Sr^a Isaelse dos Santos Silva pela ajuda na revisão de literatura.

A Capes pela concessão da bolsa de estudo.

A todos que contribuíram de uma forma ou de outra para a conclusão deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	
ABSTRACT	
INTRODUÇÃO	01
Capítulo 1	
MULTIPLICAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE BABOSA (<i>Aloe vera</i> L.)	15
Capítulo 2	
DESENVOLVIMENTO, ENRAIZAMENTO E ACLIMATAÇÃO DE MICROPLANTAS DE BABOSA (<i>Aloe vera</i> L.)	31
CONSIDERAÇÕES FINAIS	42

MICROPROPAGAÇÃO DE BABOSA (*Aloe vera* L.)

Autora: Candice Ferreira de Brito

Orientador: Weliton Antonio Bastos de Almeida

RESUMO: O cultivo *in vitro* é uma ferramenta que permite aumentar a taxa de multiplicação em curto espaço de tempo. Neste sentido o objetivo deste trabalho foi desenvolver procedimentos que permitissem a regeneração *in vitro* de plantas de *Aloe vera* a partir de gemas axilares. As gemas axilares retiradas de plantas de babosa foram devidamente desinfestadas e em seguida introduzidas em meio de cultura MS suplementado com BAP (0,0; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 mg. L⁻¹). Avaliou-se o número de brotos por explante e a percentagem de explantes responsivos. Após 30 dias de cultivo observaram-se maiores taxas de explantes responsivos para os meios contendo as concentrações de 3,0 e 4,0 mg. L⁻¹ de BAP, os quais apresentaram 70 e 72 % de explantes responsivos, respectivamente e 3,0 brotos por explantes responsivos em ambas as concentrações. Os brotos obtidos na multiplicação da babosa foram transferidos para meio MS contendo 1,0 mg L⁻¹ GA₃ e 1,0 g L⁻¹ de carvão ativado, nas concentrações de 3,0 e 4,0 mg L⁻¹ de BAP. Após 60 dias avaliou-se a percentagem de enraizamento, número de raízes, comprimento da maior raiz, altura da planta, número de brotos e o número de folhas. As variáveis avaliadas não apresentaram diferenças significativas quando se testou as distintas concentrações de BAP associadas ao ácido giberélico. Os resultados encontrados para as concentrações de 3,0 e 4,0 mg. L⁻¹ de BAP foram de 100% de enraizamento para ambos; 4,46 e 4,26 para o número de folhas; 7,99 e 6,59 para o comprimento da maior raiz e 6,64 e 5,72 para a altura de plantas, respectivamente. A aclimação resultou em sobrevivência de 100% de plantas. Tais resultados comprovam que nas condições testadas, o desenvolvimento e a aclimação das plantas de babosa são considerados satisfatório.

Palavras-chave: Cultivo *in vitro*, Gemas axilares, Plantas medicinais, BAP.

MICROPROPAGATION OF BABOSA (*Aloe vera* L.)

Author: Candice Ferreira de Brito

Adviser: Weliton Antonio Bastos de Almeida

ABSTRACT: In vitro cultivation of plants is a tool allowing plant multiplication at fastest rate in a short periodo of time. In this regards, the present study aimed to develop procedures for the regeneration of Babosa plant (*Aloe vera* L.) from axillary buds. After the buds removal they were sterilized and put into a MS media supplemented with BAP (0, 1, 2, 3 and 4 mg.L⁻¹). The number of shoots/explant and the percentage of responsive explants were evaluated. After 30 days, the medias having 3 and 4 mg.L⁻¹ of BAP showed the best growth rates, being 70 e 72% higher, respectively, and three new shoots for each explant under each concentration. In a new phase, the obtained shoots were transferred for a MS media containing 1 mg.L⁻¹ GA₃ and 1 g.L⁻¹ of activated coal for each concentration of 3 and 4 mg.L⁻¹ of BAP. After 60 days, it was evaluated the rooting percentage, number of roots and the length of the longest root, plant height, number of shoots, and leaf number. The variables evaluated showed no significant differences for the different concentrations of BAP associated with the GA₃. For the 3 and 4 mg.L⁻¹ of BAP concentrations, it were observed 100% of rooting capability, 4.46 and 4,26 for leaf number, 7,99 and 6,59 for root length, and 6,64 and 5,72 for plant height, respectively. The acclimation results in 100% of plant survivals. These results support that, for he studied conditions, the development and acclimation of babosa plants are satisfactory.

Key words: in vitro cultivation, axillar buds, medical plants, BAP

INTRODUÇÃO

O consumo de cosméticos e medicamentos elaborados a partir de produtos naturais tem crescido nos últimos anos e isso tem estimulado empresas a investir 10% de seus recursos financeiros em pesquisas com novas substâncias de origem vegetal (NADER & MATEO, 1998). O uso de plantas medicinais pela população mundial tem sido muito significativo nos últimos tempos. Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) mostram que cerca de 80% da população mundial fez o uso de algum tipo de erva, seus extratos vegetais ou seus princípios ativos na busca de alívio de alguma sintomatologia dolorosa ou desagradável (IUCN, 1993). Essa situação é mais evidente nos países em desenvolvimento, onde a maior parte da população não tem acesso aos medicamentos e faz uso secular de plantas. Mesmo em países industrializados, como os Estados Unidos, cerca de vinte e cinco por cento de todos os medicamentos prescritos, dispensados por farmácias comunitárias, entre 1959 e 1980, continham substâncias ativas oriundas de plantas superiores (FARNSWORTH & SOEJARTO, 1985).

A utilização de plantas medicinais, tem inclusive recebido incentivos da própria OMS. São muitos os fatores, principalmente econômicos e sociais, que vêm colaborando no desenvolvimento de práticas de saúde que incluam plantas medicinais.

Mais de 100.000 compostos secundários de plantas já foram isolados e identificados, e a cada ano centenas de novas descobertas tem aumentado esse número (VERPOORTE et al., 1988). Muitos destes compostos são consumidos diariamente por nós na forma de dentifrícios, sabonetes, perfumes ou mesmo

ingeridos em alguns alimentos, condimentos, chás, xaropes etc. A eficácia e segurança de muitas plantas medicinais já foram comprovadas cientificamente o que as legitimizam como recurso terapêutico benéfico e indispensável à humanidade. Estima-se ainda que o consumo de produtos fitoterápicos em todo o mundo irá triplicar nos próximos dez anos (GRÜNWARD, 1997). Entretanto, há problemas de vários níveis que limitam o seu uso.

A grande maioria das plantas medicinais é coletada em habitat natural e por maior que seja o número de indivíduos numa localidade não são suficientes para atender uma demanda constante e ininterrupta, principalmente quando a espécie tem multiusos. Apenas o cultivo sistematizado pode garantir produção regular e em larga escala. Para se estabelecer sistemas de cultivo adequados se faz necessário material propagativo como sementes, tubérculos, estolões, enfim algum tipo de estrutura que permita a multiplicação da planta alvo. Muitas espécies medicinais apresentam problemas com as sementes ou com partes vegetativas que limitam a sua multiplicação em escala.

Babosa: uso e produtos medicinais

As espécies do gênero *Aloe* da família LILIACEAE, atualmente denominada ALOEACEAE, são vulgarmente conhecidas como babosas. A Babosa é uma planta nativa das zonas secas, do Sul e leste da África; naturalizada no norte da África. Está disseminada por muitos países de clima quente e úmido de quase todos os continentes. No Brasil encontra-se no sul, centro oeste e nordeste de preferência (AGGARWAL & BARNA, 2004).

Normalmente, seu cultivo é feito nos jardins, para fins ornamentais. Além de seu efeito ornamental, as babosas têm sido usadas como plantas medicinais de uso interno e externo, é uma planta economicamente importante por suas propriedades terapêuticas excepcionais (REHM & ESPIG, 1991). Atualmente seu uso está sendo incrementado notoriamente por seu amplo espectro de benefícios em diferentes propósitos, por isso as plantas são exploradas comercialmente (LEWINGSTON, 1990). Pelo seu uso já consagrado desde os antigos egípcios e, atualmente, com seu

crescente emprego em cosmética e em queimaduras, a demanda destas plantas tem incrementado o seu cultivo.

Embora existam mais de 250 espécies do gênero *Aloe*, somente três ou quatro dessas apresentam propriedades medicinais, sendo a *Aloe vera* a de maior interesse, possuindo também valor nutricional. As folhas dessa espécie possuem uma aparência suculenta, sendo que o mesofilo contém reservas de água que podem suprir a necessidade da planta durante longos períodos de seca, favorecendo sua sobrevivência em lugares de clima árido. Estudos fitoquímicos têm demonstrado a presença de uma série de compostos de interesse farmacológico oriundos dos metabolismos primário e secundário da *A. vera*, utilizados em formulações (géis e sucos) preparadas a partir desta planta. Como exemplos de compostos mencionam-se: enzimas (lipases, bradiquinases e proteases), mono e polissacarídeos (glucomanas), aminoácidos, vitaminas (A, B12, C e D), antraquinonas (aloína e emodina), saponinas, ácido salicílico, lignina e esteróides (lupeol e campesterol). A esses compostos têm sido atribuídas diversas atividades biológicas, tais como antisséptica [saponinas e antraquinonas], antitumoral [mucopolissacarídeos], antiinflamatória [esteróides e ácido salicílico], antioxidante [vitaminas], imunoreguladora e detoxificante [glucomanas] (WEINER & WEINER, 1994).

Devido ao amplo espectro de aplicações na área de saúde humana, os produtos à base de babosa vêm apresentando forte expansão no mercado nacional e internacional. Esse fato determina uma maior demanda por matéria-prima de alta qualidade, sendo esse aspecto uma restrição à expansão dessa atividade, devido à pequena disponibilidade de biomassa de babosa no nosso mercado interno. O aumento da oferta de biomassa pressupõe a existência de incrementos de produtividade dos cultivos e/ou a expansão da área desses. Em último caso, a implantação de cultivos com altos rendimentos tem como premissa básica a utilização de material de plantio de alta qualidade genética e sanitária, além de colocá-lo disponível no comércio.

A propagação de *Aloe vera* é realizada por meio da remoção de brotações laterais emitidas pela planta-mãe, principalmente ao longo da estação de crescimento. O número e a frequência de brotos laterais emitidos são bastante

variáveis, fato que dificulta o planejamento de um sistema produtivo de mudas no que concerne ao seu rendimento. Em geral, três ou quatro brotos laterais são emitidos/ano/planta-mãe. Esta condição gera um sistema de produção com baixo rendimento, sendo um processo moroso e caro, principalmente quando se considera o tempo necessário para a obtenção de um número de mudas que permita a implantação de 1 hectare, por exemplo, com valores de densidade de plantio de 12.000 a 16.000 plantas por hectare, como usualmente é observado em plantios comerciais dessa espécie. Adicionalmente, esse sistema clássico de produção de mudas apresenta como característica uma maior probabilidade de ocorrência de moléstias no material de plantio, em função das lesões que são feitas à planta-mãe e às mudas (brotos laterais), no momento de sua coleta. O quadro acima descrito tem gerado uma situação de limitação da disponibilidade de material de plantio com qualidade genética e sanitária superiores, dificultando a instalação de novas áreas de cultivo. Conseqüentemente, a disponibilidade de matéria-prima para a elaboração de produtos nas indústrias de cosméticos (estéticos e dermatológicos), de fitoterápicos (purgativos e cicatrizantes) e alimentícia (complementos nutricionais e energéticos) é reduzida, e caracteriza um ponto de estrangulamento no processo produtivo. Esse fato vem contribuindo significativamente para a elevação de preços do produto final e dificultando a expansão da atividade, tanto no mercado interno quanto no externo (ARAÚJO et al 2002). Como solução tecnológica viável para a resolução desse problema, a produção de mudas com qualidade superior e em larga escala pode ser feita através de técnicas biotecnológicas.

Cultura de Tecidos Vegetais

A cultura de células e tecidos vegetais vem, desde o início da década de 70, constituindo uma estratégia de interesse, em função de suas potencialidades e de resultados apresentados para um grande número de espécies vegetais. Tal abordagem tem permitido a clonagem e a multiplicação em larga escala de espécies vegetais, os quais, quando multiplicados por processos convencionais (estaquia, enxertia, sementes, alporquia, etc.), apresentam baixos valores de rendimento. Nos

últimos anos, a superação dessa dificuldade tem sido conseguida, em diversos casos, com a utilização de técnicas de produção de mudas *in vitro* (NOLETO & SILVEIRA, 2004).

A micropropagação é a técnica de maior aplicabilidade da cultura de tecido e tem sido utilizada para multiplicar centenas de espécies medicinais. Essa técnica é usada rotineiramente para multiplicar genótipos selecionados, ou para substituir acessos que tenham adquirido caracteres indesejáveis como baixa produtividade e susceptibilidade a doenças. Plantas que são cultivadas em larga escala, fora de seu centro de origem, também têm sido micropropagadas. A multiplicação *in vitro* de plantas inteiras, a partir da cultura de gemas e meristemas, é basicamente uma extensão da propagação vegetativa feita em muitas espécies (FIDELIS et al. 2000).

A técnica da cultura de tecidos tem como base os mesmos princípios anatomo-fisiológicos envolvidos no crescimento e desenvolvimento de qualquer planta sobre outras condições (SERRANO, 1996). Esta metodologia vem sendo aplicada em grande número de plantas herbáceas e lenhosas, sendo geralmente o mais rápido, eficiente e confiável método de micropropagação. Porém, a competência morfogenética *in vitro* é complexa e indiretamente influenciada por fatores fisiológicos e ambientais (NOLETO & SILVEIRA, 2004).

Várias são as modalidades de padrão morfogenético *in vitro*, podendo ser por via direta, com desenvolvimento de novos órgãos diretamente do explante ou indireta, como a cultura de calos. Estes calos podem ser submetidos a determinadas condições hormonais, as quais podem direcioná-los para o crescimento desorganizado ou para o desenvolvimento de órgãos, como gemas, raízes ou embriões, por organogênese ou embriogênese (CALDAS, 1996).

Segundo Pierik (1990), a propagação vegetativa *in vitro* apresenta cinco estágios diferentes. A fase 0 corresponde aos tratamentos dados à planta matriz, de onde são retirados os explantes. A fase 1 representa o momento em que um explante é isolado sob condições estéreis. A fase 2 é a fase de propagação, em que se objetiva conseguir a propagação do material vegetal sem a perda da estabilidade genética. A fase 3 envolve a preparação das brotações ou das microplantas obtidas na fase 2, para a transferência ao solo. Esse processo pode envolver a interrupção

da formação de brotos axilares e o início do seu alongamento. Posteriormente, deve-se induzir a formação de raízes, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. A quarta e última fase é a da transferência das microplantas do tubo de ensaio para o solo e o conseqüente estabelecimento.

Segundo Caldas et al. (1990), a composição e a concentração hormonal no meio de cultura são fatores determinantes do crescimento e do padrão de desenvolvimento na maioria dos sistemas utilizados na cultura de tecidos.

Torres et al. (2001) descrevem que o meio de cultura é constituído de componentes essenciais (água, sais inorgânicos, fonte de carbono e energia, vitaminas e reguladores de crescimento) e opcionais (aminoácidos, amidas, ácidos orgânicos e substâncias naturais complexas), que controlam, em grande parte, o padrão de desenvolvimento *in vitro*.

As plantas ou explantes cultivados *in vitro* possuem exigências nutricionais específicas. Assim, ao se excisar parte da planta para o cultivo *in vitro*, observa-se que os explantes não são completamente autotróficos e requerem meio nutritivo para suplementar suas necessidades exógenas, em termos de elementos essenciais, constituintes orgânicos e energia (TORRES et al., 2001).

Dentre os principais meios nutritivos utilizados para o cultivo *in vitro*, há o MS, desenvolvido por Murashige & Skoog (1962). O melhor crescimento de células e tecidos de plantas em meio MS tem sido atribuído, em grande parte, à alta concentração de amônio e nitrato. Além do nitrogênio, o potássio no meio 'MS' encontra-se também em dosagens altas, assim como outros macronutrientes, porém, em dosagens menos elevadas. O aumento na concentração dos sais encontrados no meio MS proporcionou ganhos significativos no crescimento de tecidos e células em diversas espécies de plantas, tornando-o o meio de cultivo mais utilizado em trabalhos de cultura de tecidos vegetais. Entretanto, este meio apresenta baixo nível de fosfato que, para muitos pesquisadores, é insuficiente para sustentar crescimento de muitas culturas.

Na maioria das vezes, os explantes não iniciam o processo de enraizamento em meios com concentrações altas de sais, apesar das auxinas presentes. Altas concentrações de sais tendem a inibir todas as fases do enraizamento,

particularmente o crescimento de raízes. Concentrações de sais no meio diminuídas para 1/2, 1/3 ou 1/4, possibilitam melhor enraizamento (HU & WANG, 1983). Os componentes que, quando em excesso, inibem o enraizamento são os macronutrientes. Os micronutrientes, em virtude de sua baixa concentração original, não requerem diluição. No entanto, as diluições excessivas dos macronutrientes podem ocasionar deficiências minerais da parte aérea enraizada (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1990).

Segundo Grattapaglia & Machado (1998), a rizogênese pode ser dividida em três fases: indução, iniciação e alongamento. Porém, o sistema radicular adventício emitido em meio semi-solidificado com ágar ou produto equivalente é, em geral, pouco ramificado, quebradiço e isento de pêlos radiculares (LEITE, 1995), de modo que as raízes assim formadas são pouco eficientes na absorção de água e nutrientes, durante a aclimatização (HOFFMANN et al., 2001).

A formação de raízes adventícias em várias espécies lenhosas tem sido beneficiada pelo uso de carvão ativado no meio de enraizamento. Dotada de uma alta capacidade de adsorção, esta substância tem a propriedade de modificar a composição dos meios de cultura, adsorvendo uma série de substâncias adicionadas ao meio, liberadas pelos explantes ou presentes no agar, que possam afetar negativamente o crescimento. Outra propriedade atribuída ao carvão ativado é o favorecimento do processo de enraizamento, devido à redução da intensidade de luz na região de formação de raiz (ASSIS & TEIXEIRA, 1998).

Uma das peculiaridades da cultura de tecidos vegetais é a possibilidade quase absoluta de controle do crescimento e do desenvolvimento das plantas. Isso não seria possível sem a adição dos reguladores de crescimento ao meio de cultura, pois são estes componentes que direcionam o metabolismo do explante *in vitro* para o processo desejado (PASQUAL, 2001).

A ocorrência de escurecimento de tecidos do explante tem sido atribuída à liberação e oxidação de compostos fenólicos que inibem o crescimento do explante. Preece & Compton (1991) caracterizaram as substâncias encontradas em meio de cultura para algumas espécies lenhosas e as identificaram como sendo fenóis, flavonóides e taninos, e responsáveis pela oxidação. Grattapaglia & Machado (1998)

recomendam para controlar a oxidação as seguintes medidas: lavagem do material antes da desinfestação em água corrente, auxiliando na lixiviação dos compostos fenólicos; utilização de antioxidantes: ácido ascórbico, polivinilpirrolidone (PVP), carvão ativado e incubação inicial dos explantes no escuro. O carvão ativado age promovendo adsorção dos exudatos liberados pelo explante, os quais provocam a oxidação; além de possuir as propriedades de adsorver e reduzir a disponibilidade de auxina exógena no meio de cultura e induzir o processo de rizogênese (George, 1996). O PVP reage com os compostos oxidantes e os ácidos cítrico e ascórbico reagem com os metais presentes no meio de cultura, evitando que os mesmos fiquem disponíveis para se oxidarem (GEORGE, 1996).

Diferentes espécies e até mesmo diferentes indivíduos dentro de uma mesma espécie possuem características genéticas particulares que provocam diferentes respostas quando cultivados *in vitro*. Além disso, a expressão das características genéticas é grandemente afetada pelo ambiente. Desta forma, o material vegetal utilizado para iniciar o cultivo *in vitro*, bem como sua manipulação antes e logo após a excisão do explante é essencial para o êxito da micropropagação. Os explantes podem apresentar diferentes tipos celulares e graus de diferenciação, tais como fragmentos de folha e segmentos de caule, ou serem histologicamente mais homogêneos, como meristemas e medula caulinar (FLORES et al 1998)

O sistema mais utilizado na micropropagação é a proliferação de gemas axilares, que utiliza como explantes iniciais o meristema propriamente dito e as gemas apical e lateral, os quais são vantajosos por apresentarem um broto dormente que já está diferenciado *in vivo*. Desta forma, o estabelecimento de uma planta completa requer somente alongamento e diferenciação de raízes. Tendo em vista a propagação de plantas homogêneas e geneticamente estáveis, os explantes ideais para a regeneração são aqueles contendo gemas pré-existentes, como os segmentos nodais e apicais (DEBERGH & READ, 1991), uma vez que, não sendo necessária a desdiferenciação celular, há uma menor probabilidade de regeneração de plantas com variação somaclonal. Em geral, sob condições ideais, esses explantes regeneram plantas por longos períodos de tempo; porém, em algumas espécies, há uma redução na organogênese ao longo dos subcultivos (HUSSEY,

1986; MANTELL et al., 1994). Além disso, a determinação da duração da cultura e do intervalo entre os subcultivos são aspectos essenciais para evitar a regeneração de plantas com alterações genéticas e/ou epigenéticas (KLERK, 1990).

Há necessidade de eliminação superficial de microrganismos dos explantes antes de introduzi-los nos frascos de cultivo. Essa etapa deve obrigatoriamente ser realizada em capela de fluxo laminar, em condições assépticas, utilizando vidraria previamente esterilizada. O método mais freqüente de descontaminação é a utilização de etanol a 70% seguido de água sanitária (hipoclorito de sódio) em diferentes diluições. Contudo, precauções especiais necessitam ser tomadas quando os explantes são derivados de plantas crescidas no campo. Outro procedimento importante é a lavagem abundante do material vegetal ao chegar ao laboratório.

De acordo com Caldas et al.(1998), a composição e concentração de reguladores de crescimento no meio de cultivo são fatores determinantes no crescimento e no padrão de desenvolvimento na maioria dos sistemas de culturas de tecidos. Na propagação *in vitro*, os reguladores de crescimento constituem uma etapa básica a ser abordada, visto que a resposta das plantas a organogênese é dependente da interação auxinas: citocininas e do tipo de tecido utilizado (PIERIK, 1997). Segundo Grattapaglia & Machado (1998), a adição de reguladores de crescimento ao meio de cultura tem o objetivo principal de suprir as possíveis deficiências dos teores endógenos de hormônios nos explantes que se encontram isolados das regiões produtoras na planta-matriz.

Segundo Taiz & Zeiger (2004), até pouco tempo atrás, os principais grupos de hormônios vegetais (e reguladores de crescimento) eram: auxinas, citocininas, giberelinas, etileno e ácido abscísico. Entretanto, atualmente, há fortes evidências da existência de um outro grupo de hormônios vegetais, os brassinoesteróides. A morfogênese *in vitro* requer, geralmente, um ajuste nos níveis de auxinas e citocininas. Uma relação mais alta entre auxina e citocinina é geralmente requerida para que o processo da rizogênese ocorra. O contrário é necessário para a indução de brotações.

Elevadas concentrações de citocininas e baixas de auxinas induzem, predominantemente, a formação de gemas em detrimento da formação de raízes e

calos e vice-versa. O BAP (benzilaminopurina) tem sido a citocinina mais utilizada devido a sua eficiência na multiplicação da parte aérea e indução de gemas adventícias (HOFFMANN, et al., 1998). Além disso, fatores como o genótipo utilizado, tipos e concentrações de reguladores vegetais, tipos e tamanhos de explantes, meios de cultura e condições de cultivo podem influenciar decisivamente no potencial regenerativo de determinada espécie (BERED et al., 1999).

As citocininas são reguladores de crescimento que desempenham um papel fundamental no crescimento e morfogênese em cultura de tecidos, estimulando a divisão celular, bem como, a indução e a proliferação de brotações adventícias (SANTOS, 2005).

Auxinas são substâncias quimicamente relacionadas com o ácido indol-3-acético (AIA), que é a auxina principal de várias plantas. Essas substâncias têm em comum a capacidade de atuar na expansão e no alongamento celular, ajudando também na divisão celular em cultura de tecidos, principalmente no enraizamento. Entre outras substâncias usadas para o enraizamento *in vitro* estão o ácido naftaleno acético (ANA), o ácido 2-4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e o ácido indolbutírico (AIB) (RADMANN, 2002).

De acordo com Preece & Sutter (1991), a elevada umidade relativa e a baixa irradiância no ambiente *in vitro* são os principais fatores que atuam na indução de alterações e funcionalidade de órgãos e tecidos, levando-os à incapacidade de controlar as perdas de água quando são submetidos a condições adversas, como o ambiente natural. Por esse motivo, torna-se necessária uma gradual aclimatização, a fim de que as plantas sobrevivam quando transferidas para diferente condição ambiental.

A passagem das plantas do ambiente *in vitro*, que apresenta alta umidade relativa do ar, completa assepsia, e iluminação, temperatura e fotoperíodo controlados, para o *ex vitro* deve ser gradual. Isto é conseguido por meio da disposição das plantas sob túnel plástico, com luminosidade, temperatura (20-28 °C) e irrigação controladas, simulando a condição do laboratório. Em seguida, deve-se proceder a remoção gradual do plástico, de forma a permitir que as plantas passem do estado heterotrófico, no qual dependiam de um suprimento externo de energia, no

caso a sacarose, para o estado autotrófico, em que se faz necessária a realização de fotossíntese para sobreviver (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1990).

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um protocolo eficiente de micropropagação a partir de gemas axilares de babosa (*Aloe vera* L.).

REFERÊNCIAS

AGGARWAL, D.; BARNA, K, S. Tissue culture propagation of short communication elite plant of *Aloe vera* Linn. *J. Plant Biochemistry & Biotechnology*, v. 13, p. 77-79, jan. 2004.

ARAÚJO, P. S. et al. Micropropagação de babosa (*Aloe vera*-Liliaceae). *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, n. 25, p. 54-57, mar./abr. 2002.

ASSIS, T.F.; TEIXEIRA, S.L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI; EMBRAPA-CNPH, 1998. v.1, p.261-296.

BERED, F. et al. High cytokinin accumulation following root tip excision changes the endogenous auxin-to-cytokinin ratio during root-to-shoot conversion in *Catasetum fimbriatum* Lindl. (Orchidaceae). *Plant Cell Rep.*, v. 18, p.1002-1006, 1999.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI; EMBRAPA-CNPH, 1998. v.1, p.87-132.

CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. (Ed.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP; EMBRAPA/CNPH, 1990. p.37-70.

CALDAS, L.S. Micropropagação de plantas do cerrado. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 47., 1996, Nova Friburgo. **Anais...** Nova Friburgo, RJ,: Sociedade Brasileira de Botânica, 1996. p.22.

DEBERGH, P.C.; READ, P.E. Micropropagation In: DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN, R.H. **Micropropagation: technology and application**. London: Kluwer Academic, 1991. p.1-13.

FARNSWORTH, N. R.; SOEJARTO, D. D. Potential consequence of plant extinction in the United States on the current and future availability of prescription drugs. **Economic Botany**, v. 39, p. 232-40, 1985.

FIDELIS, I. et al. características anatômicas de estruturas vegetativas de *Brosimum gaudichaudii* téc. desenvolvidas in vitro e in vivo. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.24, n.2, p.327-336, abr./jun., 2000.

FLORES, R. et al. Regeneração in vitro de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart.) **Rev. Bras. de Agrociência**, v.4, n 3, 201-205, set.-dez.,1998.

GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture: the technology**. Edington: Exegetics, 1996. Part 1.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture: in practice**. 2.ed. Edington: Exegetics, 1996. Part 2.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J.A. (Eds). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAP/CNPH, 1998. p.183-260.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. (Eds.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP;EMBRAPA/CNPH, 1990, p.99-169.

GRÜNWARD, J. The market situation and marketing of herbal medicinal products (HMP) in Europe. In: WORLD CONGRESS ON MEDICINAL AND AROMATIC PLANTS FOR HUMAN WELFARE, 2. 1997, Mendoza (Argentina). **Abstracts...** Buenos Aires: CMAP/ISHS/SAIPA, 1997.

HU, C.Y.; WANG, P.J. Meristem, shoot tip and bud culture. In: EVANS, D.A.; SHARP, W.R.et al. (Eds.). **Handbook of plant cell cultures**. New York: Macmillan, 1983. v.1, p.177-227.

HOFFMANN, A. et al. Substratos na indução e desenvolvimento *in vitro* de raízes em dois porta-enxertos de macieira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.36, n.11, p.1371-1379, nov. 2001.

HUSSEY, G. Problems and prospects in the in vitro propagation of herbaceous plants. In: WITHERS, L. A.; ALDERSON, P.G. **Plant tissue culture and its agricultural applications**. London: Butterworths, 1986. Cap. 6, p. 69-84.

IUCN – THE INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE AND NATURAL RESOURCES. **Guidelines on the conservation of medicinal plants**. Gland: Switzerland, 1993. 50 p.

KLERK, G.J. How to measure somaclonal variation. **Acta Botanica Neerlandica**, Oxford, v.38, n.2, p.129-144, 1990.

LEITE, G.B. **Efeito de reguladores de crescimento, substratos, sacarose e intensidade luminosa na micropropagação de pereira (*Pyrus communis* L.)cv. Bartlett e do clone OH x F97**. 1995. 50f.. Dissertação (Mestrado em Fruticultura)-Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

LEWINGSTON, A. Plants for people. **The Natural History Museum**. Kew, London: Royal Botanic Gardens, 1990.

MANTELL S. H.; MATTHEWS, J. A.; MCKEE, R. A. **Princípios de biotecnologia de plantas**: uma introdução à engenharia genética de plantas. Ribeirão Preto, Sociedade Brasileira de Genética, 1994.

NADER, W.; MATEO,N. 1998. Biodiversity-resource for new products, development and self reliance. In: BARTHLOTT, W. ; WINIGER, M. **Biodiversity**: a challenge for development research and policy. Berlin: Springer, 1998.p. 121-126.

NOLETO, L. G.; SILVEIRA, C. E. dos S. Micropropagação de copaíba. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 33, p. 109-120, julh./dez. 2004.

PASQUAL, M. **Textos acadêmicos**: meios de cultura. Lavras: FAEPE/UFLA, 2001. 127p.

PIERIK, R.L.M. **Cultivo *in vitro* de las plantas superiores**. Madrid: Mundi-Prensa, 1990. 326p.

PIERIK, R. L. M. ***In vitro* culture of higher plants**. 4.ed. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1997. 348 p.

PREECE, J.E.; SUTTER, E.G. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. In: DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN, R.H. (Eds.). **Micropropagation**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1991.

PREECE, F. E.; COMPTON, M. E. I. Problems with explant exudation in micropropagation. In: BAJAJ, Y. P. S. **Biotechnology in agriculture and forestry**. Berlin: Springer Verlag, 1991. p.168-189. (High-Tech and micropropagation, 1).

RADMANN, E. B. et al. Efeito de auxinas e condições de cultivo no enraizamento *in vitro* de porta-enxertos de macieira 'M-9'. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal, SP, v. 24, n. 3, p. 624-628, Dezembro 2002.

REHM, S.; ESPIG, G. **The Cultivated Plants of the Tropics and Subtropics: cultivation, economic value, utilization.** Berlin: Prieese GmbH, 1991.

SANTOS, A. S. de A. et al. Concentrações de bap e tdz na propagação *in vitro* de curauá (*Anana erectifolius* L. B. Smith). **Biociencia**, n. 35, p. 62-65, julh./dez. 2005.

SERRANO, M. S.; PIÑOL SERRA, M. T. **Biociencia vegetal.** ciencias de la vida p.285. 1996.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal.** 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719p.

TORRES, A.C. et al. **Meios e condições de incubação para a cultura de tecidos de plantas:** formulações de meio de cultura de tecidos de plantas. Brasília: EMBRAPA, 2001. 19p. (Circular técnica, 24).

VASIL, I. K. Developing cell and tissue culture systems for the improvement of cereal and grape crops. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 128, p. 193-218, 1987.

VERPOORTE R, V. der H.; HOOPEN, H. H. J. G.; MEMELINK, J. Metabolic engineering for the improvement of plant secondary metabolite production. **Plant Tissue Culture and Biotechnology** . n. 4, p. 3-20, 1998..

WEINER, M.; WEINER J. A. Herbs that heal. Mill Valley, **Quantum Books**, 1994.

CAPÍTULO 1

MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE BABOSA (*Aloe vera* L.)¹

¹ Artigo ajustado a ser submetido ao Comitê Editorial do periódico científico Ciência e Agrotecnologia

MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE BABOSA (*Aloe vera* L.)

RESUMO

Os produtos à base de babosa vêm apresentando forte expansão no mercado, devido ao aumento do uso destes na área da saúde humana, o que determina uma maior demanda por matéria-prima de alta qualidade. Neste caso, a cultura de células e tecidos vegetais vem se constituindo numa estratégia de interesse, em função de suas potencialidades. O objetivo deste trabalho foi de avaliar a taxa de multiplicação *in vitro* da babosa sob diferentes concentrações de BAP. O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. As gemas axilares retiradas de plantas de babosa foram desinfestadas em solução de álcool etílico na concentração de 70% durante 2 minutos e em solução de hipoclorito de sódio na concentração de 1:1, durante 20 minutos. Posteriormente, foram lavadas 3 vezes em câmara de fluxo laminar com água destilada e autoclavada, e introduzidas em frascos contendo meio de cultura MS suplementado com BAP (0,0; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 mg. L⁻¹). Em seguida foram mantidas em câmara de crescimento, com temperatura de 27 ± 2 °C e fotoperíodo de 16 h. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 10 repetições, contendo uma gema por repetição. Avaliou-se o número de brotos por explante e a percentagem de explantes responsivos. Após 30 dias de cultivo observaram-se maiores taxas de explantes responsivos para os meios contendo as concentrações de 3,0 e 4,0 mg. L⁻¹ de BAP, os quais apresentaram 70 e 72 % de explantes responsivos, respectivamente, e 3,0 brotos por explantes responsivos em ambas as concentrações.

Palavras-chave: Cultura de tecidos, Plantas medicinais, Biotecnologia.

***IN VITRO* MULTIPLICATION OF BABAOSA (*Aloe vera* L.)**

ABSTRACT

Products derived from babosa have been presenting strong expansion in the market due to increasing use in human health determining a higher demand for high quality primary matter. In this regards, the cell and tissue culture are being a new strategy of interest due to their potentialities. The objective of this work was to evaluate the *in vitro* multiplication rate of babosa under different concentration of BAP. The experiment was carried out in the Plant Tissue Culture Laboratory of the Center of Agrarian, Environmental and Biological Sciences of the Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Axillar buds removed from babosa plants were sterilizes for 2 minutes in a solution of 70% alcohol and for 20 minutes in a 50% sodium hipochloride solution. Afterward, the buds were washed three times under a laminar flux chamber with distil and autoclaved water and then put into flasks containing the MS media supplemented with 0, 1, 2, 3, and 4 mg.L⁻¹ of BAP. The experimental design was entirely randomizes with 10 replications, and one bud/repetition. The number of shoots/explant and the percentage of responsive explants were evaluated. After 30 days, the medias having 3 and 4 mg.L⁻¹ of BAP showed the best growth rates, being 70 e 72% higher, respectively, and three new shoots for each explant under each concentration. In a new phase, the obtained shoots were transferred for a MS media containing 1 mg.L⁻¹ GA₃ and 1 g.L⁻¹ of activated coal for each concentration of 3 and 4 mg.L⁻¹ of BAP.

Key Words: Tissue culture, medical plants, biotechnology.

INTRODUÇÃO

A babosa-verdadeira, *Aloe vera* (L.) Burm. f., espécie pertencente à família Aloeaceae, é bastante conhecida por suas propriedades terapêuticas. Ela tem sido utilizada como planta medicinal de uso interno e externo, além de ser também empregada como ornamental (CASTRO & RAMOS, 2002). De sua mucilagem, podem se obter comercialmente antibióticos, hormônios, anestésicos, substâncias coagulantes, compostos adstringentes etc.. Esta planta tem seu uso conhecido há séculos. Atualmente, ela tem sido empregada em cosmética na produção de xampu e, principalmente, no tratamento de queimaduras. Há, portanto, uma crescente demanda no seu cultivo e a propagação da espécie constitui uma etapa fundamental deste processo (CASTRO & RAMOS, 2002).

As informações científico-agronômicas sobre plantas medicinais crescem em ritmo lento, havendo carência de resultados de pesquisa sobre métodos de propagação e técnicas de cultivo que possam resultar em maior produção de biomassa e ainda garantir a perpetuação da espécie (MADUEÑO-BOX, 1973; PAVARINO, 1995). A micropropagação, entre outras técnicas da cultura de tecidos de plantas, tem proporcionado a obtenção de um grande número de plantas com elevado nível qualitativo. Mais especificamente, tem permitido a eliminação, em curto espaço de tempo, de viroses do material vegetativo, proporcionando melhores benefícios aos produtores, com conseqüente aumento na produtividade (NEHRA et al., 1990; GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). É uma técnica que vem sendo utilizada para a propagação rápida de espécies que levam longo tempo para germinar, possuem baixa taxa de frutificação e que estão em via de extinção. Atualmente, muitas plantas medicinais já são multiplicadas *in vitro*. Por meio da biotecnologia, é possível aumentar a produção e diminuir o preço dos princípios ativos fitoquímicos (BAJAJ et al., 1988; MIACHIR, 1992).

Na propagação *in vitro*, os reguladores de crescimento constituem uma etapa básica a ser abordada, visto que a resposta das plantas a organogênese é dependente da interação auxinas: citocininas e do tipo de tecido utilizado (PIERIK, 1997). Além disso, fatores como o genótipo, tipos e concentrações de reguladores

vegetais, tipos e tamanhos de explantes, meios de cultura e condições de cultivo podem influenciar decisivamente no potencial regenerativo de determinada espécie (BERED et al., 1999). Dentre os reguladores de crescimento, as citocininas são substâncias que estão diretamente relacionadas com a divisão celular. Na cultura de ápices caulinares, esses hormônios são utilizados principalmente para a proliferação de gemas axilares, através da capacidade de modificação da dominância apical (BHOJWANI & RAZDAN, 1996). O BAP é uma das citocininas de menor custo e têm sido muito eficaz na multiplicação de diversas espécies. A razão disso pode estar na capacidade dos tecidos vegetais em metabolizar os hormônios naturais mais rapidamente do que os sintéticos (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

As exigências nutricionais requeridas para o crescimento de um tecido em condições *in vitro* variam de espécie para espécie, de variedade para variedade e até mesmo dentro da própria planta, necessitando-se, assim, otimizar os meios de cultura (NAGAO, et al., 1994). Contudo, não há uma formulação padrão para essa otimização, mas o meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), com suas modificações e diluições, tem apresentado resultados satisfatórios para diversas espécies (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1990).

Devido a ausência de informações na literatura sobre a micropropagação de *Aloe vera* L., o presente trabalho teve como objetivo definir técnicas para a determinação de um protocolo eficiente de multiplicação *in vitro* desta espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

1. Micropropagação a partir de gemas axilares.

Utilizaram-se gemas axilares retiradas de plantas de babosa oriundas do campo. As gemas foram desinfestadas em solução de álcool etílico na concentração de 70% durante 2 minutos sob agitação, seguida de imersão em solução de hipoclorito de sódio e água na concentração de 1:1, durante 20 minutos. Posteriormente, foram lavadas 3 vezes em câmara de fluxo laminar com água destilada e autoclavada, onde foram introduzidas em frascos contendo 20 mL meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), suplementado com BAP (0,0; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 mg L⁻¹), 30 g L⁻¹ de sacarose e solidificado com ágar (0,8%). O pH do meio de cultura foi ajustado a 5,8, anteriormente à autoclavagem a 120 °C por 20 minutos. Em seguida, foram mantidas em câmara de crescimento, com temperatura de 27 ± 2 °C e fotoperíodo de 16 horas. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com 10 repetições, contendo uma gema em cada repetição. Após 30 dias de cultivo, avaliou-se o número brotos por explantes e a percentagem de explantes responsivos.

A partir daí, transferiu-se cada broto seccionado longitudinalmente para frascos contendo meio MS nas concentrações de 3,0 e 4,0 mg. L⁻¹ BAP, com o intuito de aumentar a taxa de multiplicação. Após 30 dias, avaliou-se novamente o número de brotos e percentagem de explantes responsivos.

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente e aqueles que apresentaram diferença significativa foram submetidos a teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os dados foram analisados no programa SISVAR - Sistema de análises de variância para dados balanceados.

2. Indução de organogênese a partir de segmentos foliares.

Segmentos foliares (± 1 cm) foram extraídos de brotações regeneradas *in vitro* e introduzidos em placa de petri contendo 20 mL do meio de cultura MS, suplementado com BAP (3,0; 4,0; 5,0 mg L⁻¹), 1,0 g L⁻¹ de carvão ativado, 30 g L⁻¹ de sacarose e solidificado com ágar (0,8%). O pH do meio de cultura foi ajustado a

5.8, anteriormente à autoclavagem a 120 °C por 20 minutos. Em seguida, foram mantidas em câmara de crescimento, com temperatura de 27 ± 2 °C e fotoperíodo de 16 horas. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com 5 repetições, contendo 10 segmentos em cada repetição.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Micropropagação a partir de gemas axilares.

Verificou-se que após 30 dias de cultivo *in vitro*, houve resposta morfogênica das gemas axilares mantidas em meio de cultura MS nas concentrações de 3,0 e 4,0 mg L⁻¹ de BAP, com resultados de 70 e 72% respectivamente de explantes responsivos, não apresentando diferença significativa no número de brotos obtidos entre as duas concentrações (Tabela 1). Não foi verificado nenhum resultado positivo em relação às demais concentrações utilizadas, não havendo assim resposta morfogênica dos explantes de babosa em concentrações menores que 3,0 mg L⁻¹ de BAP e na ausência de citocinina no meio de cultura. Resultado semelhante foi obtido por Pasqual e Ando (1989) micropropagando *Citrus sinensis*, Al-Khayri & Al-Bahrany (2001) em ensaios com *Citrus aurantifolia*, e Pereira et al. (1995) em espinheira santa (*Maytenus ilicifolia*). Mohanty et al. (1998) também relataram à importância da citocinina na indução de brotações de *C. sinensis*.

Segundo Pinto e Pasqual (1990), certos tecidos sintetizam as quantidades de hormônios que necessitam, enquanto outros são totalmente dependentes da adição exógena. O material vegetativo para multiplicar pode ser enquadrado em quatro categorias: ausência de regulador, presença de citocininas, presença de auxina, interação entre auxina e citocininas. No presente trabalho, o material vegetativo necessitou da presença de citocinina para que ocorresse a proliferação de brotações. O maior número de brotações foi obtido quando houve acréscimo nos níveis de BAP.

Tabela 1. Resposta morfogênica de gemas axilares de babosa (*Aloe vera* L.) em função da concentração de BAP, após 30 dias de cultivo *in vitro*.

Concentração de BAP (mg.L ⁻¹)	Explantes responsivos (%)	Brotos/explantes responsivos (nº)
0,0	0,0b	0,0b
1,0	0,0b	0,0b
2,0	0,0b	0,0b
3,0	70,0a	3,0a
4,0	72,0a	3,0a

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente (Tukey 0,05).

Conforme Capaldi (2002) a citocinina exógena tem sido considerada responsável pelo estímulo ao desenvolvimento das brotações laterais em muitas espécies de plantas pelo aumento da atividade meristemática. Em estudos comparativos de diferentes concentrações de nitrato e amônio no meio de cultura para multiplicação de *Cryptomeria japonica*, os melhores resultados referentes à taxa de formação de brotações foram alcançados nos tratamentos com presença de BAP.

Após o seccionamento longitudinal dos brotos a média da taxa de multiplicação aumentou, alcançando 4,5 e 4,3 brotos/explante nas concentrações de 3,0 e 4,0 mgL⁻¹ de BAP, respectivamente. Porém, não diferiu estatisticamente entre si (Tabela 2).

Tabela 2. Número médio de brotos por explante após 30 dias de cultivo e do seccionamento longitudinal e repicagem para as concentrações 3,0 e 4,0 mg L⁻¹ de BAP.

Concentração de BAP (mg.L ⁻¹)	Nº de brotos/explante
3,0	4,5a
4,0	4,3a

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente (Tukey 0,05).

Numa projeção de quantidade de brotos a partir de gemas axilares nessas condições descritas no presente trabalho, pode-se alcançar em 120 dias 150 brotos

por gema axilar introduzida *in vitro*. Levando em consideração que cada planta possui cerca de 10 gemas, pode-se alcançar um montante de 1500 brotos num intervalo de 4 meses.

Pereira et al. (2000), avaliando a propagação *in vitro* de chapéu-de-couro *Echinodorus cf. scaber*, observaram que o número de brotações e folhas aumentou com o aumento dos níveis de BAP, ainda que o tamanho das brotações tenha diminuído. Quando os explantes secundários de chapéu-de-couro foram inoculados em meio MS ausente de regulador de crescimento observou-se que não houve formação de brotações. Nesse caso, o material vegetativo necessitou da presença de citocinina para que ocorresse a proliferação de brotações. Os segmentos nodais cultivados em meio suplementado com BAP formaram brotações e estas foram induzidas em todos os tratamentos em que o BAP foi utilizado, o que não foi observado para a babosa, que não apresentou brotações nas concentrações de 1,0 e 2,0 mg L⁻¹ de BAP.

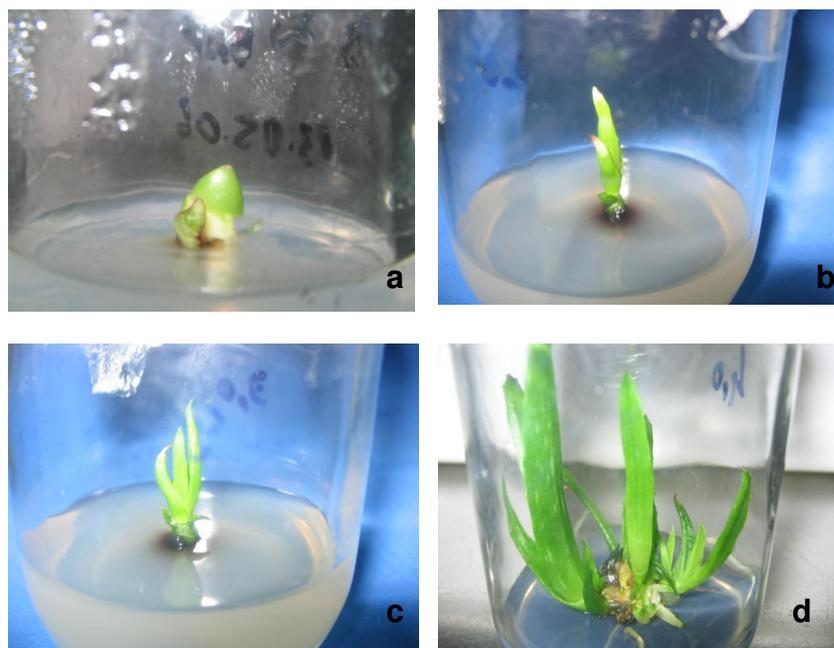


Figura 1. Multiplicação *in vitro* de *Aloe vera* L. a partir de gemas axilares. a) entumescimento de gemas após 15 dias de cultivo. b) brotação após 30 dias de cultivo. c) brotação após 30 dias de cultivo apresentando oxidação do explante. d) brotações múltiplas após 60 dias.

Para a propagação *in vitro* de figueira (*Ficus carica* L.), a adição ao meio de cultivo de apenas BAP sem ANA proporcionou os melhores resultados, sendo o maior número de brotos formados entre as concentrações de 2,0 e 4,0 mg L⁻¹. Nesse caso o efeito benéfico do BAP na multiplicação das brotações pode ser relacionado com a influência desse regulador de crescimento na divisão celular e na quebra de dormência das gemas axilares, até então inibidas pela dominância apical (Brum, 2002). Resultados semelhantes foram observados na multiplicação de macieira e videira, onde o maior número de brotações foi induzido pela utilização de BAP isoladamente sem a presença de demais reguladores.

Erig et al. (2002) avaliando a utilização de BAP e AIB na multiplicação *in vitro* da amoreira-preta *Rubus idaeus* concluíram que em relação ao BAP, até a terceira semana de multiplicação, as concentrações de 2,0 e 4,0 µM foram responsáveis pelo maior número de brotações (0,67 e 0,87 respectivamente) e na quarta semana as concentrações de 2,0; 4,0 e 6,0 µM apresentaram resultados semelhantes.

Em estudos com aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All), Andrade et al.(2000) também observaram que somente em concentrações mais elevadas de BAP, em torno de 4,5 µM os segmentos nodal e apical apresentaram regeneração direta com média de 90%, sendo uma brotação por explante. Abaixo disso a alta relação entre auxina e citocinina leva à maior formação de raízes em detrimento à formação de parte aérea, o que pode ter causado pouca formação de brotos pela necrose e morte dos explantes.

Silva et al. (2002) observaram que a aplicação de BAP no meio de cultura para a proliferação *in vitro* de abacaxizeiro, aumentou o número total de brotos até a concentração máxima de 2,52 mg L⁻¹, a partir da qual houve um efeito negativo. A redução do número de brotos, após uma concentração máxima de BAP, também foi observada por Pasqual & Hoshika (1992) em trabalho testando o efeito de BAP sobre a proliferação *in vitro* de *Gymnocalidium buldiamur* L. De acordo com Guevara (1987), existe uma concentração máxima para que se tenha uma resposta satisfatória no desenvolvimento de brotos, acima da qual há um efeito inibitório, provavelmente devido à fitotoxidez causada pelo regulador de crescimento.

De acordo com Cantagallo et al. (2005) estudando a micropropagação de citrumelo 'swingle' pelo cultivo *in vitro* de gemas axilares observaram que a adição de BAP ao meio de cultura influenciou positivamente na indução de brotações, porém com efeitos contrários aos observados para a babosa. Segundo as avaliações realizadas constatou-se que o maior número de brotos de 'swingle' seriam obtidos na concentração de $0,89 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP, notando-se uma tendência de redução de brotações nas concentrações superiores. Foi ainda observado que embora a elevação das concentrações de BAP pudesse resultar em diminuição do número de brotos, a ausência desse regulador vegetal resultou em baixa produção de brotos.

Debiasi et al., (2004) avaliando a micropropagação de gengibre (*Zingiber officinale*) constatou que aos 30 dias de cultivo os resultados referentes às médias do número de brotações mostraram que os tratamentos não diferiram estatisticamente entre si, porém o tratamento com adição de 1.0 mg L^{-1} de BAP ao meio MS se sobressaiu em relação aos demais, com indução média de 4,1 novos brotos. Resultado semelhante foi encontrado para *Hypericum perforatum* L. onde o meio MS acrescido de BAP que apresentou maior número de brotos com até 11 brotos (Hypericum).

Indução de organogênese a partir de segmentos foliares.

Com o intuito de induzir a formação de gemas adventícias a partir de explantes não meristemáticos, então se utilizou segmentos foliares. Os resultados demonstraram que após 30 dias de instalação do experimento para indução de organogênese a partir deste tipo de explante não foi observada a existência de brotações provenientes dos explantes (Figura 2).

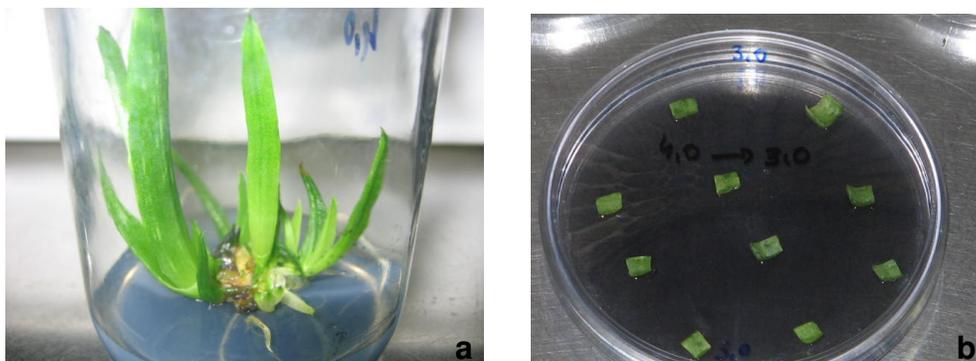


Figura 2. Indução de organogênese a partir de segmentos foliares. a) Planta estabelecida *in vitro*, utilizada como fonte de explante. b) Placa contendo segmentos foliares em meio de cultura com carvão ativado e suplementado com BAP e com ausência de formação de gemas adventícias.

Apezato-da-Glória et al. (1999), encontraram resultados positivos em discos de folhas de *Passiflora edulis* Sims f. flaricarpa Deg. e o adição exógena de BAP no meio MS foi fundamental para a resposta organogenética. Já Almeida et al., (2003) utilizando discos foliares em quatro variedades de *Citrus sinensis* L. Osbeck, encontraram resposta positiva apenas para laranja 'Hamelin' com a adição de BAP (1,0 e 2,5 mg L⁻¹), embora com baixo número de gemas adventícias.

A utilização de explantes não meristemáticos é importante em técnicas biotecnológicas como a transformação genética via *Agrobacterium*, em virtude de evitar ou minimizar a obtenção de plantas quiméricas (Cervera et al., 1998).

CONCLUSÕES

- A multiplicação *in vitro* de gemas axilares de *Aloe vera* L. constitui-se em um processo possível e viável nas condições avaliadas
- A adição de BAP ao meio de cultura influenciou positivamente na indução de brotações.

- O maior número de brotações foi alcançado com a aplicação das concentrações de 3,0 e 4,0 mg L⁻¹ de BAP.
- É possível obter 1500 plantas de babosa, partindo de uma única planta matriz, num período de quatro meses.
- Não houve resposta organogenética quando se utilizou segmentos foliares.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, W. A. B. de et al. Genetic transformation and plant recovery from mature tissues of citrus sinensis osbeck L. **Plant Science**, v. 164, p. 213-211, 2003.

AL-KHAYRI, J.M.; AL-BAHRANY, A.M. *In vitro* micropropagation of *Citrus aurantifolia* (lime). **Current Science**, Bangalore, v.81, n.9, p.1242-1246, 2001.

ANDRADE, M. W. de et al. micropropagação da aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.24, n.1, p.174-180, jan./mar., 2000.

APEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; VIEIRA, M. L. C.; DORNELAS, M. C. Anatomical studies of *in vitro* organogenesis induced in leaf-derived explants of passionfruit. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, p. 2007-2013, 1999.

BAJAJ, Y. P. S.; FURMANOWA, M.; OLSZOWSK, O. Biotechnology of the micropropagation of medicinal and aromatic plants. In: BAJAJ, Y. P. S. **Biotechnology in agriculture and forestry**. Berlin: Springer Verlag, 1988. v. 4, p. 60-103.

BERED, F. et al. High cytokinin accumulation following root tip excision changes the endogenous auxin-to-cytokinin ratio during root-to-shoot conversion in *Catasetum fimbriatum* Lindl. (Orchidaceae). **Plant Cell Rep.**, v. 18, p. 1002-1006, 1999.

BHOJWANI, S.S.; RAZDAN, M.K. **Plant tissue culture: theory and practice**. New York: Usevier, 1996. 767p

BRUM, G.R.; SILVA, A. B.; PASQUAL, M. Efeito de diferentes concentrações de bap e ana na propagação *in vitro* da figueira (*Ficus carica* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras. Edição Especial, p.1403-1409, dez., 2002.

CANTAGALLO, F. de S. et al. Micropropagação de citrumelo 'swingle' pelo cultivo *in vitro* de gemas axilares. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal - SP, v. 27, n. 1, p. 136-138, abr. 2005

CAPALDI, F. R; **Avaliação de diferentes fontes de nitrogênio em explantes de *Cryptomeria japonica* D. DON. "ELEGANS" cultivados in vitro: análises bioquímicas e relações entre reguladores vegetais.** 2002. 60f Dissertação (Mestrado). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba, 2002.

CASTRO, L. O.; RAMOS, R. L. D. **Cultivo de três espécies de babosa:** descrição botânica e cultivo de *Aloe arborescens* Mill. babosaverde, *Aloe saponaria* (Aiton) Haw. babosa-listrada e *Aloe vera* L. Burm. f., babosa-verdadeira ou aloe-de curaçau (Aloeaceae). Porto Alegre: FEPAGRO, 2002. (Circular Técnica, 20).

CERVERA, M. et al. Genetic transformation and regeneration of mature tissue of wood fruit plants bypassing the juvenile stage. **Transgenic Research**, v. 7, p. 51-59, 1998.

DEBIASI, C.; FELTRIN, F.; MICHELUZZI, F. de C. Micropropagação de gengibre (*zingiber officinale*). **Revista brasileira Agrociência**, v. 10, n. 1, p. 61-65, jan-mar, 2004.

ERIG, A. C.; ROSSI, A. D.; FORTES, G. R. de L. 6-benzilaminopurina e ácido indolbutírico na multiplicação *in vitro* de amoreira-preta (*Rubus idaeus* L.), cv. TUPY. **Ciência Rural**, v 32, n5, p 765-770.2002.

GUEVARA, E. B. Reguladores de crescimento. In: **II Curso de cultivo de tecidos**. [S.l.]: Turrialba, p. 58-79, 1987.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP; EMBRAPA / CNPH, 1990. p.99-160.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação de plantas**. Brasília: EMBRAPA/SPI; EMBRAPA/CNPH, 1998. v. I, p. 183-260.

MADUEÑO-BOX, M. **Cultivo de plantas medicinales**. 2. ed. Madrid: Aguilar, 1973. 239 p.

MIACHIR, J. I. **Proposição de um protocolo de cultura de tecidos para produção de compostos secundários para *Curcuma zedoaria* Roscoe**. 1992. 126 f.

Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 1992.

MOHANTY, S.; DEKA, P.C.; BHATTACHARYA, S. Micropropagation of *citrus sinensis* cultivar Musambi. **Indian Journal of Agricultural Sciences**, New Delhi, v. 68, n.2, p.113-116, 1998.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised *medium* for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.

NAGAO, E. O.; PASQUAL, M.; RAMOS, J.D. Efeitos da sacarose e do nitrogênio inorgânico sobre a multiplicação “in vitro” de brotações de porta-enxerto de citros. **Bragantia**, Campinas, v.53, n.1, p.25-31, 1994.

NEHRA, N. S.; STUSLNOFF, C.; KARTHA, K. K. Regeneration of plants from immature leaf-derived callus of strawberry (*Fragaria X Ananassa*). **Plant Science**, Shannon, v. 66, p. 119-126, 1990.

PASQUAL, M.; ANDO, A. Micropropagação da laranja ‘Valência’ através da cultura de gemas axilares *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.24, n.6, p.723-726, 1989.

PASQUAL, M.; HOSHIKA, E. Efeitos do ácido naftaleno acético e 6-benzilaminopurina sobre a proliferação *in vitro* de cactos *Gymnocalycium buldianum* L. e *Mammillaria bocassana* L. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 4, p. 589-593, 1992.

PAVARINO, M. A. **Viabilidade de mini-estaquia de raízes em cinco espécies de uso medicinal**. Brasília: Universidade de Brasília, 1995. 12 p.

PEREIRA, A.M.S. et al. Effect of phytohormones and physiological characteristics of the explants on micropropagation of *Maitenus ilicifolia*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.42, p.295-297, 1995.

PEREIRA, F. D. et al. Propagação *in vitro* de chapéu-de-couro (*Echinodorus cf. scaber* RATAJ), uma planta medicinal. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.24, p.74-80, dez., 2000. (Edição especial).

PIERIK, R. L. M. **In vitro culture of higher plants**. 4.ed. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1997. 348 p.

PINTO, J. E. B. P.; PASQUAL, M. **Introdução a cultura de tecidos**, Lavras: ESAL. 1990. 73p. (Apostila).

SILVA, A. B. da et al. Influência da benzilaminopurina e do benomyl na proliferação *in vitro* de abacaxizeiro. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras. v.26, n.6, p.1190-1196, nov./dez., 2002.

CAPÍTULO 2

DESENVOLVIMENTO, ENRAIZAMENTO E ACLIMATAÇÃO DE MICROPLANTAS DE BABOSA (*Aloe vera* L.)¹

¹ Artigo submetido ao Comitê Editorial do periódico científico Ciência e Agrotecnologia

DESENVOLVIMENTO, ENRAIZAMENTO E ACLIMATAÇÃO DE MICROPLANTAS DE BABOSA (*Aloe vera* L.)

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o desenvolvimento e enraizamento *in vitro* bem como a aclimação de brotações de babosa. Os brotos obtidos na multiplicação da babosa foram transferidos para meio de cultura MS, acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose e solidificado com agar (0,8%). No meio de cultura foram adicionados 1,0 mg L⁻¹ GA₃ e 1,0 g L⁻¹ de carvão ativado, nas concentrações de 3,0 e 4,0 mg L⁻¹ de BAP. Após 60 dias avaliou-se a percentagem de enraizamento, número de raízes, comprimento da maior raiz, altura da planta, número de brotos e o número de folhas. Na fase de aclimação as microplantas desenvolvidas *in vitro*, foram lavadas em água corrente, a seguir transferidas para copos plásticos descartáveis (300 mL) contendo terra vegetal autoclavada. Diariamente fazia-se uma irrigação deixando a planta descoberta por alguns minutos, sendo que este tempo era aumentado gradativamente a cada dia. As avaliações do experimento foram efetuadas após 30 dias de cultivo. As variáveis analisadas não apresentaram diferenças significativas nos seus resultados quando se testou as diferentes concentrações de BAP associadas ao ácido giberélico. Os resultados encontrados para as concentrações de 3,0 e 4,0 mg. L⁻¹ de BAP foram, respectivamente, de 100% de enraizamento para ambos; 4,46 e 4,26 para o número de folhas; 7,99 e 6,59 para o comprimento da maior raiz e 6,64 e 5,72 para a altura de plantas. A aclimação resultou em sobrevivência de 100% de plantas. Tais resultados comprovam que nas condições testadas, o desenvolvimento e a aclimação das plantas de babosa são considerados satisfatório.

Palavras-chave: BAP, Ácido giberélico, Desenvolvimento *in vitro*.

DEVELOPMENT, ROOTING AND ACLIMATION OF MICROPLANTS OF BABAOSA (Aloe vera L.)

ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the in vitro rooting, development, and acclimation of babosa shoots. The shoots obtained from in vitro multiplication of babosa were transferred for different MS media containing 3 and 4 mg.L⁻¹ of BAP, and supplemented with 1 mg.L⁻¹ of GA₃ and 1 g.L⁻¹ of activated coal. After 60 days, it was evaluated the rooting percentage, number of roots and the length of the longest root, plant height, number of shoots, and leaf number. In the phase of acclimation the microplants developed in vitro were washed in running water and transferred to plastic cups (300 ml) with autoclaved substrat. Daily, an irrigation was done, uncovering the plants for a few minutes. This time was increased gradually for each day of irrigation. 30 days after the beginning of the cultivation the experiment was evaluated. The variables did not show any significant differences in relation to the interaction of BAP and gibberelic acid. . For the 3 and 4 mg.L⁻¹ of BAP concentrations, it were observed 100% of rooting capability, 4.46 and 4,26 for leaf number, 7,99 and 6,59 for root length, and 6,64 and 5,72 for plant height, respectively. The acclimation results in 100% of plant survivals. These results support that, for he studied conditions, the development and acclimation of babosa plants are satisfactory.

Key words: BAP, Gibberelic Acid, in vitro development.

INTRODUÇÃO

A *Aloe vera* mais conhecida como babosa, pertence a família LILIACEAE, é uma planta de origem africana mas muito cultivada no Brasil. Geralmente é encontrada em jardins onde é apreciada como ornamental, porém apresenta uma grande importância como planta medicinal. Devido ao amplo espectro de aplicações na área de saúde humana, os produtos à base de babosa vêm apresentando forte expansão no mercado nacional e internacional (AGGARWAL & BARNA, 2004).

A grande maioria das plantas medicinais é coletada em habitat natural e por maior que seja o número de indivíduos numa localidade não é suficiente para atender uma demanda constante e ininterrupta, principalmente quando a espécie tem multiusos. Apenas o cultivo sistematizado pode garantir produção regular e em larga escala. Para se estabelecer sistemas de cultivo adequados se faz necessário material propagativo como sementes, tubérculos, estolões, enfim algum tipo de estrutura que permita a multiplicação da planta alvo. Muitas espécies medicinais apresentam problemas com as sementes ou com partes vegetativas que limitam a sua multiplicação em larga escala. Assim, as técnicas de cultivo *in vitro* são indicadas para essas espécies (ARAÚJO et al., 2002).

O sistema mais utilizado na micropropagação é a proliferação de gemas axilares, que utiliza como explantes iniciais o meristema propriamente dito e as gemas apical e lateral, os quais são vantajosos por apresentarem um broto dormente que já está diferenciado *in vivo*. Desta forma, o estabelecimento de uma planta completa requer somente alongamento e diferenciação de raízes. Na propagação *in vitro*, os reguladores de crescimento constituem uma etapa básica a ser abordada, visto que a resposta das plantas a organogênese é dependente da interação auxinas: citocininas e do tipo de tecido utilizado (PIERIK, 1997). Segundo Grattapaglia & Machado (1998), a adição de reguladores de crescimento ao meio de cultura tem o objetivo principal de suprir as possíveis deficiências dos teores endógenos de hormônios nos explantes que se encontram isolados das regiões produtoras na planta-matriz.

Os reguladores de crescimento são substâncias sintéticas que, apresentam propriedades químicas semelhantes a dos hormônios vegetais (TOMBOLATO & COSTA, 1998). As auxinas e as citocininas são as classes de reguladores de crescimento mais utilizadas na cultura de tecidos. O tipo de citocinina e sua concentração são os principais fatores que influenciam o sucesso da multiplicação *in vitro*. Testes de diversas combinações de citocinina com outros reguladores de crescimento são muito comuns para o ajustamento dos meios de cultura (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). O BAP (6-benzilaminopurina) tem sido muito eficiente na multiplicação de partes aéreas e indução de gemas adventícias em diversas espécies (HU & WANG, 1983), e é a citocinina mais utilizada. Para multiplicação em meio de cultura, em geral, suas concentrações variam de 0,1 a 5 mg L⁻¹ (SANTOS et al, 2005). A formação de raiz, parte aérea e calo em cultura de tecidos são regulados pela disponibilidade e interação dessas duas classes de reguladores de crescimento (SKOOG & MILLER, 1957). O efeito desses reguladores pode está relacionado com os fatores genéticos próprios de cada espécie (ERIG & SCHUCH, 2005). As giberelinas têm como principal efeito estimular o crescimento de órgãos já formados, mas podem inibir a iniciação de outros processos de formação de órgãos (TAIZ & ZEIGER, 2004). As giberelinas incrementam tanto a divisão celular quanto o alongamento das células formadas (ONO et al, 2004).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o desenvolvimento e enraizamento *in vitro* bem como a aclimatação de brotações de babosa.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, do Centro de Ciências Agrárias, ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

Os brotos obtidos na multiplicação da babosa foram transferidos para frascos contendo meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), acrescidos de 30 g L⁻¹ de sacarose e solidificado com agar (0,8%). Em seguida, foram mantidas em câmara de crescimento, com temperatura de 27 ± 2 °C e fotoperíodo de 16 horas. No meio foi

adicionado $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ GA_3 e $1,0 \text{ g L}^{-1}$ de carvão ativado mantendo nas concentrações de 3,0 e $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP. Não foi necessária a adição de regulador de crescimento para indução do enraizamento.

Após 60 dias avaliou-se a percentagem de enraizamento, número de raízes, comprimento da maior raiz, altura da planta, número de brotos e o número de folhas. Os dados foram analisados estatisticamente e aqueles que apresentaram diferença significativa, foram submetidos a teste de Tukey a 5% de probabilidade no programa SISVAR - Sistema de análises de variância para dados balanceados.

Aclimação

As microplantas desenvolvidas *in vitro*, foram retiradas dos frascos de vidro e lavadas em água corrente para retirar o excesso de meio de cultura, a seguir transferidas para copos plásticos descartáveis (300 mL) contendo terra vegetal autoclavada. A passagem das plantas do ambiente *in vitro*, que apresenta alta umidade relativa do ar, completa assepsia, iluminação, temperatura e fotoperíodo controlados, para o *ex vitro* deve ser gradual. Isto foi conseguido por meio da disposição das plantas sob sacos plásticos, com luminosidade, temperatura e irrigação controladas, simulando a condição do laboratório. Em seguida, procedeu-se a remoção gradual do plástico, de forma a permitir que as plantas passem assim do estado heterotrófico, no qual dependiam de um suprimento externo de energia, no caso a sacarose, para o estado autotrófico, em que se faz necessária a realização de fotossíntese para sobreviver. As avaliações do experimento foram efetuadas após 30 dias de cultivo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No processo de desenvolvimento *in vitro* da babosa (*Aloe vera* L.), as brotações apresentaram um bom desempenho tanto no desenvolvimento da parte aérea quanto no radicular, verificou-se uma percentagem de 100% de plantas enraizadas (Tabela 1 e Figura 1).

Tabela 1. Altura média das plantas, número médio de folhas, percentagem de enraizamento e comprimento da maior raiz de plantas de babosa (*Aloe vera* L.) após 60 dias de cultivo.

Concentração de BAP (mgL ⁻¹)	Altura das plantas (cm)	Nº de folhas	% enraizamento	Comp. maior raiz
3	6,64a	4,46a	100	7,99a
4	5,72a	4,26a	100	6,59a

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente (Tukey 0,05%).

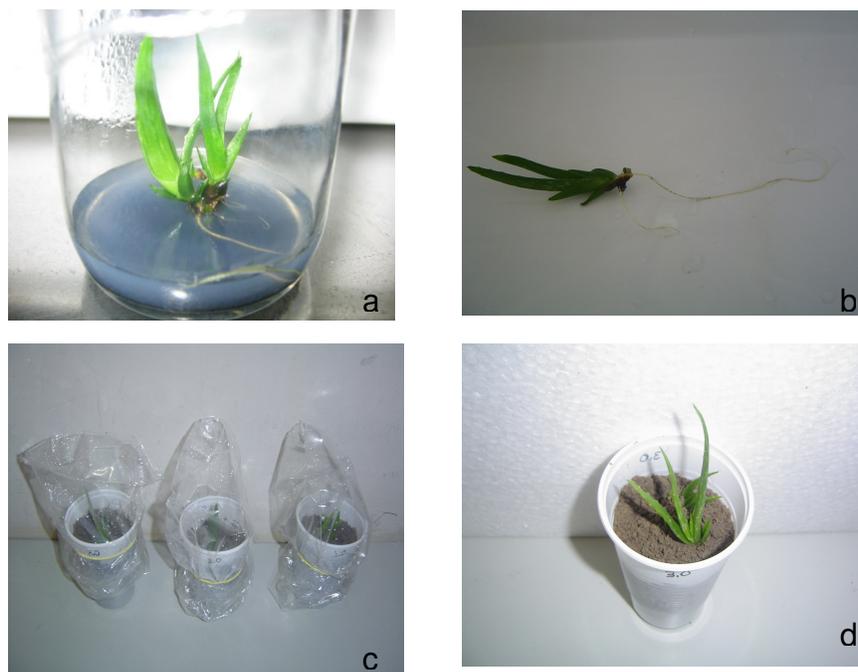


Figura 1. Desenvolvimento *in vitro* e aclimação de plantas de babosa. a) Microplanta desenvolvida de babosa; b) Microplanta regenerada com raiz após 60 dias; c) Microplantas em condições de aclimação; d) Planta aclimatada após 30 dias de período de aclimação.

A adição de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de GA_3 no meio de cultura promoveu o desenvolvimento das plantas, que na ausência do mesmo não apresentaram alongamento no desenvolvimento (dados não apresentados). Segundo Grattapaglia & Machado (1998), o efeito mais conhecido das giberelinas *in vitro* é no alongamento das partes aéreas quando essas não estão em condições de serem individualizadas para o enraizamento.

Mishra et al. (1999) descreveram o alongamento dos internódios de *Emblica officinalis* Gaertn., quando utilizaram $1,0 \text{ mg. L}^{-1}$ de GA_3 , enquanto $3,0 \text{ mg. L}^{-1}$ causou desfolhamento de alguns explantes. Figueredo et al. (2001) também relataram a necessidade do GA_3 para o alongamento das brotações de *Rollinia mucosa* Jacq.

Yui et al. (1990), trabalhando com macieira, observaram que não houve diferença significativa para os níveis de 0,0; 0,01; 0,1 e $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de GA_3 . Os mesmos autores concluíram que o GA_3 é dispensável nos trabalhos de multiplicação da macieira *in vitro*, estando de acordo com as informações de Oliveira et al. (2001), que trabalhando com *Averrhoa bilimbi* L. em meio de cultura contendo $1,0 \text{ mg. L}^{-1}$ de GA_3 verificaram que a presença de giberelina pouco contribuiu para o crescimento dos explantes, significando que as giberelinas não promovem respostas positivas.

Decetti (2000) relatou o efeito prejudicial do GA_3 no desenvolvimento de brotações de *Annona glabra* L., além da ocorrência de necrose apical e abscisão foliar.

Melo-Farias et al. (1998); Ochatt & Caso (1983) e George (1996) afirmam que o efeito do GA_3 na proliferação de brotações varia conforme a interação existente com outros reguladores de crescimento, dependendo da espécie que está sendo micropropagada, dessa forma pode-se observar efeitos tanto positivos quanto negativos na utilização de giberelina.

Assim como para o número médio de brotações por explante (capítulo 1), as demais variáveis avaliadas não apresentaram diferenças significativas nos seus resultados quando se testou as diferentes concentrações de BAP associadas ao ácido giberélico. Os resultados encontrados para as concentrações de 3,0 e $4,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP foram respectivamente de 100% de enraizamento para ambos; 4,46 e 4,26 para o número de folhas; 7,99 e 6,59 para o comprimento da maior raiz e 6,64 e

5,72 para a altura de plantas (Tabela 1). Tais resultados comprovam que nas condições testadas o desenvolvimento das plantas pode ser considerado satisfatório.

Não houve fase de enraizamento, ou seja, as raízes foram emitidas espontaneamente não necessitando da adição de auxina para a indução das mesmas, verificando-se que as dosagens de 3,0 e 4,0 mg L⁻¹ BAP, 1,0 mg L⁻¹ GA₃ e 1,0 g L⁻¹ de carvão ativado foram suficientes e satisfatórias para promover todas as etapas de desenvolvimento das microplantas de babosa. Isto pode ter ocorrido devido a presença do carvão ativado que segundo Grattapaglia & Machado (1998) o carvão simula a condição de escuro na qual as raízes normalmente se desenvolvem melhor, além de possuir efeito diluidor, retendo parte de todos os elementos que compõem o meio, adsorvendo compostos fenólicos inibidores do enraizamento.

Pio et al. (2002), verificaram que a adição de sacarose ao meio de cultura pode atuar como substrato para o processo de respiração celular, fornecendo energia para o processo de rizogênese, condição essa de vital importância. A presença de carboidratos no meio tem demonstrado ser essencial para a indução e desenvolvimento de raízes *in vitro*, o que pode ocorrer mesmo sem a presença de auxina como foi observado no presente trabalho para a babosa.

Cantagalo et al. (2005), observaram que para a micropropagação de citrumelo, variações na concentração de BAP no meio de cultura não influenciaram o número de brotos enraizados. E no que diz respeito às variáveis comprimento médio das raízes, altura de plantas e número médio de folhas, o tratamento sem adição de BAP promoveu resultados superiores aos demais tratamentos.

Todas as plantas enraizadas foram aclimatadas apresentando pleno desenvolvimento e adaptação ao ambiente natural, prontas para serem retiradas dos recipientes plásticos e transferidas para o solo.

CONCLUSÕES

- As plantas de babosa apresentaram desenvolvimento satisfatório nas condições utilizadas no trabalho.

- Não houve necessidade da fase de enraizamento com o adionamento de auxinas.
- Todas as plantas sobreviveram após o processo de aclimação.

REFERÊNCIAS

AGGARWAL, D.; BARNA, K. S. Tissue culture propagation of short communication elite plant of *Aloe vera* Linn. *J. Plant Biochemistry & Biotechnology*, v. 13, 77-79, jan. 2004.

ARAÚJO, P. S. et al. Micropropagação de babosa (*Aloe vera*-Liliaceae). *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, n. 25, p. 54-57, mar./abr. 2002.

DECETTI, S. F. C. **Propagação *in vitro* de *Annona glabra* L.** Lavras, 2000. 101p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, , 2000.

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Regeneração *in vitro* de brotos e raízes adventícias de marmeleiro (*Cydonia oblonga* Mill.) cvs. mc e adams, utilizados como porta-enxertos para a pereira. *Revista Brasileira de Agrociência*, Pelotas, v. 11, n. 4, p. 419-424, out-dez, 2005

FIGUEREDO, S. F. L.; ALBARELLO, N.; VIANA, V. R. C. Micropropagation of *Rollinia mucosa* (Jacq.) Baill. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*, Wallingford, v. 37, n. 4, p. 471-475, july/aug. 2001.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture: the technology.** 2. ed. Edington: Exergetics, 1996.Part 1.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. L.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília, DF: EMBRAPA/, 1998. v. 1, p. 183-260.

HU, C. Y.; WANG, P. J. Meristem, shoot tip and bud culture. In: EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; AMMIRATO, P. V.; YAMADA, Y. (Eds.). **Handbook of plant cell culture: techniques for propagation and breeding.** New York: Macmillan, 1983. p. 117-227.

MELO-FARIAS, P. C.; PETERS, J. A.; NAKASU, B. H. Micropropagação de porta-enxerto de Pereira Old Home x Farmingdale . *Revista Brasileira de Agrociência*, Pelotas, v. 2, n. 2, p. 71-78, 1998.

MISHRA, M. et al. Studies on micropropagation of aonla (*Emblica officinalis* Gaertn). **Progressive Horticulture**, Chambattia, v. 31, n. 3/4, p. 116-122, dec. 1999.

OCHATT, S. J.; CASO, O. H. In vitro propagation of peach: II. a medium for *in vitro* multiplication of 56 peach cultivars. **Fruit Varieties Journal**, v. 40, n. 2, p. 39-48, 1983.

OLIVEIRA, A. K. D. de et al. Multiplicação *in vitro* do Bilimbi utilizando-se diferentes concentrações de reguladores de crescimento. **Caatinga**, v. 14, n. 1/2, p. 37- 41, 2001.

ONO, E. O. et al. Reguladores vegetais na quebra da dominância apical de mamoeiro (*Carica papaya* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, SP, v. 26, n. 2, p. 348-350, Agosto 2004.

PIERIK, R. L. M. ***In vitro culture of higher plants***. 4.ed. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1997. 348 p.

PIO, R. et al. Enraizamento *in vitro* de brotações do porta-enxerto de citros *Tangerina sunki* x *Trifoliata english* 63-256 com o uso de sacarose e ácido indolbutírico. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.26, n.1, p.66-70, jan./fev., 2002.

SANTOS, A. S. de A. et al. Concentrações de bap e tdz na propagação *in vitro* de curauá (*Anana erectifolius* L. B. Smith). **Biociência**, n. 35, p. 62-65, julh./dez. 2005.

SKOOG, F.; MILLER, C. O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. **Symposium of Society for Experimental Biology**, New York, v. 11, p. 118-131, 1957.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 449-484.

TOMBOLATO, A. F. C.; COSTA, A. M. M. Micropropagação de plantas ornamentais. **Boletim Técnico do Instituto Agrônomo**, Campinas, n. 174, p. 58-62, maio 1998.

YUI, E. et al. Micropropagação *in vitro* da macieira (*Malus domestica* Borkh) cultivar Golden Delicious. **Ciência e Prática**, Lavras, v. 14, n. 1, p. 56-61, 1990.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Devido ao aumento da demanda por plantas medicinais e sua aplicação na medicina humana, faz-se necessário o direcionamento das pesquisas no sentido de garantir a produção de matéria-prima suficiente para atender as exigências do mercado.

Além de viabilizar a exploração deste material, técnicas de produção em larga escala irão garantir a conservação das espécies em seu habitat natural sem o risco de serem extintas.

Uma vez que a maioria das espécies exploradas precisa ser multiplicada em grande quantidade, as técnicas de multiplicação *in vitro* constituem-se em alternativa adequada e viável para a aquisição de mudas de alta qualidade fitossanitária produzidas em curto espaço de tempo.

Durante o desenvolvimento deste trabalho procurou-se avaliar as condições de propagação *in vitro* que fossem capazes de garantir resultados satisfatórios para o estabelecimento de um protocolo de multiplicação da *Aloe vera* L..

Para a multiplicação *in vitro* desta espécie foi eficiente a utilização de gemas axilares introduzidas em meio MS com a adição da citocinina BAP, o que promoveu maior número de brotações, nas concentrações 3,0 e 4,0 mg. L⁻¹. Para o desenvolvimento destas, foi demonstrado que é possível obter-se plantas aptas para a aclimação utilizando-se GA₃ no meio de cultura. O meio utilizado no desenvolvimento das plantas contendo carvão ativado para controle da oxidação, possivelmente induziu o enraizamento das brotações. Desta forma, torna-se dispensável a utilização de auxinas na fase de enraizamento.

Com os resultados obtidos verificou-se que a babosa é uma espécie de fácil aclimação, com sobrevivência de 100% das plantas.

O protocolo desenvolvido neste trabalho pode ser utilizado como base para a obtenção de grande quantidade de mudas de *Aloe vera* L. com o objetivo de suprir as necessidades crescentes no mercado farmacológico e de cosméticos.