

Desenvolvimento de protocolos para micropropagação de *Aloe vera* L

Guilherme Borghetti Calixto¹

Resumo: A babosa (*Aloe vera* L.) é uma planta com inúmeras aplicações dentro das demais áreas do conhecimento, no entanto ela apresenta muitos problemas quanto à sanidade e quantidades que a propagação vegetativa pode trazer. Por isso, é necessário desenvolver métodos rápidos e eficazes que viabilizem a propagação de mudas saudáveis. Assim, o presente trabalho tem por objetivo desenvolver um protocolo de cultura *in vitro* inicial para a babosa, visando à produção de mudas saudáveis e em grande quantidade. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, sendo composto por 3 tratamentos sendo eles: T1 - Água + 6 gotas Tween 20 (15 min), hipoclorito de sódio a 2% (15 min), álcool 70% (5 min) e posteriormente a tríplice lavagem com água; T2 - 100 hipoclorito de sódio 2% + 100mL de água + 6 gotas de Tween 20 (12 min), álcool 70% (3 min) e tríplice lavagem; T3 - hipoclorito de sódio 0,5% (20 min), álcool 70 % (1 min) e tríplice lavagem com água, com 8 repetições cada tratamento. Os resultados demonstraram que o tratamento 3 apresentou os menores índices de contaminação fúngica e bacteriana, sendo 50% para contaminação fúngica e 0% de contaminação bacteriana. A partir dos resultados, foi possível desenvolver um protocolo de assepsia adequado para a babosa sendo o T3 o melhor protocolo de assepsia.

Palavras-chave: Babosa; cultura de tecidos; propagação *in vitro*.

Development of protocols for micropropagation of *Aloe vera* L.

Abstract: The babosa (*Aloe vera* L.) is a plant with many applications within the other areas of knowledge, however it presents many problems regarding the animal and quantities that the vegetative propagation can bring. It is therefore necessary to develop rapid and effective methods that make possible the spread of healthy seedlings. The experimental design used was entirely randomized, being composed of 3 treatments being them: T1 - Water + 6 drops Tween 20 (15 min), sodium hypochlorite, 2% (15 min), 70% alcohol (5 min) and subsequently the triple washing with water; T2 - 100 sodium hypochlorite 2% + 100ml of water + 6 drops of Tween 20 (12 min), 70% alcohol (3 min) and triple washing; T3 - 0.5% sodium hypochlorite (20 min), alcohol 70 % (1 min) and triple washing with water, with 8 repetitions each treatment. The results showed that the treatment 3 presented the lowest indexes of fungal and bacterial contamination, being 50% for fungal contamination and 0% of bacterial contamination. From the results, it was possible to develop a protocol of asepsis suitable for babosa being the T3 the best protocol of asepsis.

Key words: Babosa, tissue culture, propagation *in vitro*.

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. Possui

¹ Acadêmico do curso de Agronomia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná – PUCPR Campus Toledo - E-Mail: calixto_gui@outlook.com.

inúmeros registros de sua utilização como espécie medicinal, sendo descritos mais de 70 diferentes compostos biologicamente ativos, sendo elas antioxidantes, antiinflamatórias, anticarcinogênicas, antidiabéticas, imunestimulantes, dentre outras. A vasta aplicação nos mais variados segmentos, gerou grande demanda de matéria-prima com qualidade, expandindo significativamente as áreas cultivadas (DEBIASI *et al.*, 2007).

O início de seu processo de cultivo é realizado pela obtenção de mudas (Propagação vegetativa convencional), obtidos a partir das brotações laterais, este processo é muito lento e oneroso pois se consegue em média de 4 brotos/planta/ano. Este processo pode acarretar em uma série de problemas, tendo em vista que apesar de não demonstrar o sintoma e parecer saudável, ela pode esconder pragas e doenças que vão ser passadas para as futuras mudas. Portanto, a propagação vegetativa convencional, muitas vezes necessária, funciona como eficiente veículo de propagação de doenças virais, fúngicas e bacterianas e pragas como nematoides e muitas outras (OLIVEIRA, 2007).

Bach (2007), conclui que a babosa possui viabilidade econômica, podendo reduzir os custos de produção com a obtenção de mudas com menor preço, resultando em um maior lucro para o agricultor.

Neste sentido, estabelecer um protocolo de micropropagação massal de *Aloe vera*, utilizando técnicas 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.

Aggarwal e Barna (2004) verificaram em seus estudos uma produção média de 3,3 novos brotos de *Aloe Vera* a cada 30 dias. Em trabalhos *in vitro* com *Aloe vera*, as Citocininas são frequentemente estudadas e BA a mais utilizada. Aggarwal e Barna (2004), suplementando o meio de cultura MS com 1,0 mg L⁻¹ de BA, conseguiram média de 3,3 novos brotos de *Aloe vera* a cada 30 dias de cultivo *in vitro*, assim como Abrie e Standen (2001) relataram que a utilização de 1,0 mg L⁻¹ de BA promoveu a maior produção de novos brotos de *Aloe polyphylla* cultivados *in vitro*.

Já Liao *et al.* (2004), trabalhando com *Aloe 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 melhor tratamento.

Os diferentes protocolos iniciam de assepsia vão proporcionar uma maneira mais rápida, barata e fitossanitariamente segura para a propagação massal de mudas *in vitro*. Portanto, visto a escassez de estudos relacionados a protocolos iniciais de micropropagação,

este trabalho tem como objetivo encontrar o melhor protocolo de assepsia para proporcionar ao explante, menor contaminação patogênica e oxidação, proporcionando uma cultura sadia para as próximas etapas da micropropagação.

Material e Métodos

Este experimento foi conduzido no laboratório de Biotecnologia da Escola de Ciências Agrárias e Medicina Veterinária da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR) Campus Toledo. O material vegetal (*Aloe vera* L.) utilizado foi colhido na estufa da instituição.

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, composto por 3 tratamentos de assepsia e 8 repetições para cada tratamento, totalizando 24 tubos de ensaio. Quanto às avaliações, foram determinados por avaliação contaminação por fungos, bactérias, oxidação e tecidos sadios. Sendo avaliados 7 dias após a inoculação.

Os dados obtidos foram tabulados e submetidos à análise de variância. Quando significativos, os dados foram comparados entre si pelo teste de média Tukey ao nível de 5% de probabilidade, utilizando o software SISVAR.

O processo de multiplicação foi iniciado com a obtenção das brotações laterais, com cerca de 2,5 a 4 cm de tamanho. As brotações foram submetidas a 3 tratamentos, sendo eles: T1 - Água + 6 gotas Tween 20 (15 min), hipoclorito de sódio a 2% (15 min), álcool 70% (5 min) e posteriormente a tríplice lavagem com água; T2 – 100 mL hipoclorito de sódio 2% + 100 mL de água + 6 gotas de Tween 20 (12 min), álcool 70% (3 min) e tríplice lavagem; T3 – hipoclorito de sódio 0,5% (20 min), álcool 70 % (1 min) e tríplice lavagem com água. O hipoclorito de sódio utilizado para todos os tratamentos foram preparados a partir de alvejantes comerciais a 2% de cloro ativo, e a água utilizada foi esterilizada deionizada. Para todos os tratamentos, os processos de assepsia iniciais foram realizados fora da câmara de fluxo laminar, sendo passadas para dentro da câmara de fluxo quando estes explantes foram imersos em álcool.

Posteriormente realizado parte da assepsia fora da camara de fluxo, estes ex-plantas foram passados para dentro da câmara de fluxo laminar para terminar o preceso de assepsia com alcool e realização da triplice lavagem. Para evitar a desidratação provocada pela câmara de fluxo, os explantes foram cortados com 0,5 a 1cm de tamanho dentro de uma placa de petri, onde colocou-se uma lamina de água para evitar tal desidratação do explante que foram cortados. O meio de cultura na qual os explantes foram inoculados refere-se à formulação

proposta por (MURASHIGE ; SKOOG, 1962), acrescido 30 g.L⁻¹ de sacarose e pH aferido a 5,8. Após a inoculação dos tubos, os mesmos foram colocados na sala de crescimento por um período de 7 dias no escuro.

Resultados e Discussão

Os tratamentos (protocolos de assepsia) foram influenciados significativamente ($p < 0,05$) quando comparados entre si para as variáveis analisadas, onde os tratamentos (T1, T2, T3) exerceram efeitos diferentes quanto ao controle da contaminação fúngica, contaminação bacteriana, oxidação dos tecidos e tecidos saudáveis, como mostra a Tabela 1.

Tabela 1 - Índices percentuais de assepsia das brotações laterais de *Aloe vera* L., submetidos a diferentes protocolos de assepsia.

Tratamentos	Contaminação fúngica	Contaminação bacteriana	Oxidação dos tecidos	Tecidos saudáveis
1	62,50 a	0,00 b	0,00 b	37,50 b
2	25,00 c	25,00 a	0,00 b	50,00 a
3	50,00 b	0,00 b	12,50 a	37,50 b

Medias seguidas da mesma letra minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Para a contaminação fúngica, apesar de todos os tratamentos apresentarem diferenças significativas, o T3 foi aquele que proporcionou o melhor controle fúngico, apresentando 25% de contaminação fúngica nos tubos. Posteriormente, o T2 apresentou 50% dos tubos com contaminação fúngica, e o T1, apresentou os piores resultados, onde 62,50% dos tubos foram contaminados.

Esta diminuição na contaminação fúngica pode ter sido influenciada pelo maior tempo de exposição do explante ao hipoclorito de sódio, onde o T2 e T1, foi exposto por menos tempo a mesma solução, no entanto com concentração diferente.

Vianna et al. (1997), observou que a proporção de contaminação fúngica foi 23,81% superior que à bacteriana em todos os seus tratamentos, onde houve determinada semelhança com o presente trabalho com a maior contaminação por fungos do que bactérias, exceto pela proporção citada por Vianna et al. (1997).

Motta et al. (2007), utilizando um protocolo com uma solução de hipoclorito de sódio a 30% por 20 minutos, sendo submetidos a sucessivas lavagens com água destilada e posteriormente imersos em álcool 70% por 60 segundos, observou que incrementos positivos no número de gemas emitidas pela babosa. Corroborando com os resultados obtidos neste ensaio.

Trabalhando com *Zingiber officinallle*, Debiassi *et al.* (2004) relatou que no processo de estabelecimento inicial *in vitro*, houve maior presença de fungos do que de bactérias, sendo o mesmo comportamento observado neste ensaio.

Para controle bacteriano, tanto o T1 como T2, apresentaram os mesmos resultados, onde não foi observado presença de bactéria, sugerindo que os tratamentos são eficientes no controle bacteriano. O T2 foi considerado o pior tratamento, sendo 25% dos tubos observados com contaminação por bactéria.

Vianna *et al.* (1997), realizando protocolos de assepsia para explantes de mamoeiro com hipoclorito de sódio a 1% por 10 minutos, não observou efeitos no controle de qualquer contaminação, principalmente por bactérias, diferindo-se dos resultados obtidos neste ensaio.

Diniz *et al.* (2008), utilizando somente hipoclorito de cálcio, observou grande contaminação por bactérias na ordem de 69% sobre 83% dos explantes contaminado, podendo sugerir que a utilização de álcool pode ser um complemento na assepsia do material vegetal e colaborar para diminuição de contaminação patogênicas.

Erig *et al.* (2003), quando utilizaram explantes de Mirtilo (*Vaccinium ashei Reade*), observaram que a contaminação por bactérias é praticamente nula, possuindo maior contaminação por fungos. Corroborando com os resultados observados neste ensaio.

Os tratamentos que expressaram um efetivo controle na oxidação dos explantes, foram o T1 e T2, ambos com 0% de oxidação nos tubos de ensaio. Sendo que o T3, apresentou baixo percentual de oxidação com 12,50% dos tubos de ensaio. As oxidações observadas no T3, pode ter sido promovido pela exposição demasiada a solução de assepsia.

A luz afeta diretamente a oxidação do tecido, principalmente depois que o explante sofreu cortes e estresses no processo de propagação. Logo, os baixos percentuais obtidos na oxidação dos tecidos para T1 e T2 pressupõe que, como os explantes foram colocados 7 dias no escuro, esta oxidação foi minimizada. Segundo Diniz *et al.* (2008), observando altas taxas de oxidação em seu trabalho, sugere que o tempo de exposição ao álcool proporciona maior oxidação do tecido, sugerindo menor tempo de exposição para a Lírio-da-paz.

Observou-se diferenças significativas no percentual de explantes sadios, sendo o T2, representado por 50% dos tubos de ensaio sadios. Para T1 e T3, observou-se uma igualdade no percentual de tubos com tecidos sadios, sendo 37,50% dos tecido observados. A sanidade dos tecidos pode estar intimamente ligada ao tempo de assepsia que o protocolo utilizado para a cultura possui.

Segundo Vianna *et al.* (1997), a exposição dos explantes por um maior período de tempo em hipoclorito de sódio, proporciona maior taxa de explantes saudáveis, corroborando com os resultados obtidos neste ensaio.

Leifert *et al.* (1981), as condições da planta matriz determinam a eficiência no processo de assepsia e posterior estabelecimento *in vitro*. Em determinados casos, o protocolo de assepsia varia conforme a presença de agentes patogênicos. Assim Aggarwal e Barna (2004), só conseguiram micropropagar as brotações laterais de *Aloe vera*, quando submeteram os explantes a 30 minutos em água corrente, imersão em solução de Bavistin 1% por 1 hora e em solução de Savlon por 2 minutos, seguindo de enxague em água esterilizada, imersão em álcool 70% por 30 segundos e em solução de cloreto de mercúrio 0,1% por 5 minutos, antes da inoculação, diferindo-se totalmente do protocolo de assepsia adotado neste ensaio.

Conclusão

Foi possível desenvolver um protocolo inicial de assepsia para a *Aloe vera* L., sendo o T3, o protocolo que proporcionou uma menor contaminação fúngica e bacteriana e concernem vantagens significativas quanto a quantidades de mudas que possa se obter.

Referências

- 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.
- BACH, Dionizio Bernardino.; LOPES, Marcos Aurélio. Estudo da viabilidade econômica do cultivo da babosa (*Aloe vera* L.). **Ciênc. agrotec.** Lavras, v. 31, n. 4, p. 1136-1144, jul./ago., 2007.
- DEBIASI, C.; SILVA, C.G.; PESCADOR, R. Micropropagação de babosa (*Aloe vera* L.). **Revista Brasileira de Agrobiologia**, v.10, n.1, p.65-70, 2004.
- DINIZ, J. D. N.; ALMEIDAS, J. L.; OLIVEIRA, A. B.; BEZERRA, A. M. E. Protocolo para desinfestação, multiplicação e enraizamento *in vitro* de *Spathiphyllum wallisi*. **Rev. Ciênc. Agron.**, Fortaleza, v. 39, n. 01, p. 107-113, Jan.- Mar., 2008. Centro de Ciências Agrárias - Universidade Federal do Ceará
- ERIG, A. C. et al. Desinfestação de explantes de Mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade) visando o estabelecimento de plantas *in vitro*. **Revista Científica Rural**, Bagé, v. 08, n. 01, p. 142-148, 2003.
- 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*, Dordrecht, The Netherlands, v. 76, p. 83-86, 2004.

MOTTA, Baptista, L.Z.; MILANTONIO, F. M.; LIMA, R.B. **Micropropagação e aclimação de Babosa (*Aloe vera*) cultivada em meio de cultura MS.** 3ª Mostra científica de ciências agrárias. Departamento de Química e Bioquímica, Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, SP. 2007.

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

OLIVEIRA, E.T. **Micropropagação e acompanhamento bioquímico, fisiológico e nutricional da babosa (*Aloe vera* (L.) Burm.F.) cultivada ex vitro em doses de nitrogênio.** Piracicaba, 2007. 93 p.

REUVENI, O.; SHLESINGER, D. R. & LAVI, U. **In vitro clonal propagation of dioecious *Carica papaya*.** **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, **20**:41-46, 1990.

VIANNA, Giovanni rodrigues et al. A rifampicina na descontaminação bacteriana de explantes de mamoeiro provenientes do campo. *Bragantia*, **Campinas**, v. 56, n. 2, p. 249-254, 1997.