

Efeito do seccionamento de explantes no cultivo *in vitro* de babosa (*Aloe vera*)

Gabriella Silva Oliveira Souza Ciano*^{ID}, Eldo Ciano da Silva^{ID}, Cristine Vanz Borges^{ID}, Mariane de Jesus da Silva de Carvalho^{ID}, Weliton Antonio Bastos de Almeida^{ID}

Faculdade Maria Milza – FAMAM. Rodovia BR-101 - Km 215 - Governador Mangabeira - BA - 44350-000 - Caixa Postal 53. *Autor para correspondência: gabriellasosouza@gmail.com

RESUMO: Espécies medicinais como a *Aloe vera* apresentam necessidade de otimização do seu cultivo *in vitro* através de protocolos eficazes de multiplicação *in vitro*, que supram carências da demanda no mercado farmacêutico e cosmético favorecendo a diversidade biológica da *A. vera*. Frente a isto, o trabalho tem como objetivo avaliar a influência do seccionamento dos explantes para a *A. vera* submetida a multiplicação *in vitro*. Para isso, utilizou-se como explante gemas axilares oriundas de plantas de *A. vera*. Para avaliar a influência do seccionamento do explante na multiplicação *in vitro*, cultivou-se explantes não seccionados e seccionados em meio MS com adição 0,2 mg/l de ANA e 2,0 mg/l de BAP. Os brotos foram submetidos à multiplicação por meio de três repicagens sucessivas com intervalo de 30 dias cada. O delineamento experimental utilizado nos experimentos foi o inteiramente casualizado e em esquema fatorial 3 x 2 (três subcultivos e dois tipos de explantes), com 5 repetições por tratamento, sendo a unidade experimental representada por um frasco contendo três explantes. Para tanto, a cada repicagem foram avaliadas as características: altura de planta, número de brotos (NB), número de folhas verdes (NFV), presença de folhas senescentes e presença de raiz. Os explantes seccionados combinado com a realização de subcultivos proporcionaram as melhores respostas de NB e NFV, demonstrando ser um método eficiente para a multiplicação *in vitro* de *A. vera*.

Palavras chaves: Fitocósméticos. Cultura de tecidos. Fitoterápicos. Multiplicação *in vitro*.

ABSTRACT: Effect of cleavage of explants on *in vitro* culture of *Aloe vera*. Medicinal species such as *Aloe vera* present a need to optimize their *in vitro* culture through effective *in vitro* multiplication protocols, which suppress demand in the pharmaceutical and cosmetic market favoring the biological diversity of *A. vera*. The objective of this work was to evaluate the influence of the sectioning of explants on *A. vera* submitted to *in vitro* multiplication. For this, axillary buds originating from *A. vera* plants were used as explants. To evaluate the influence of explant sectioning on *in vitro* multiplication, non-sectioned explants were cultured and sectioned in MS medium with 0.2 mg/l of ANA and 2.0 mg/l of BAP. The shoots were submitted to multiplication by means of three successive repetitions with interval of 30 days each. The experimental design was completely randomized and in a 3 x 2 factorial scheme (three subcultures and two types of explants), with 5 replicates per treatment, the experimental unit being represented by a vial containing three explants. The following characteristics were evaluated: plant height, number of shoots, number of green leaves, presence of senescent leaves and presence of roots. Sectioned explants combined with subcultures yielded the best number of shoots and number of green leaves responses, proving to be an efficient method for *in vitro* multiplication of *A. vera*.

Keywords: Phytocosmetics. Tissue culture. Herbal medicines. *In vitro* multiplication.

INTRODUÇÃO

Entre as espécies de interesse medicinal e econômico, destaca-se a *Aloe vera*, pertencente à família botânica Asphodelaceae, que tem sido utilizada corriqueiramente em aplicações tópicas, devido os seus efeitos contra doenças dermatológicas (Ni et al. 2004; Talmadge et al. 2004). Está inserida na lista das espécies medicinais de

interesse do Ministério da Saúde para uso no SUS, compoendo a Relação Nacional de Medicamentos Essenciais, publicado pela ANVISA em 2012. *A. vera* é uma planta que compõe fitoterápicos e cosméticos, sendo que os ativos mais utilizados são extraídos de suas folhas, que por sua vez antes da etapa de obtenção da forma farmacêutica passam por processos padronizados afim de produzir o derivado

Recebido para publicação em 04/06/2018

Aceito para publicação em 25/10/2021

Data de publicação em 09/11/2021

ISSN 1983-084X

© 2019 Revista Brasileira de Plantas Medicinais/Brazilian Journal of Medicinal Plants.

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license

(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

vegetal, podendo ocorrer na forma de extrato, tintura e outros (Brasil 2012).

Por apresentar grande potencial nas indústrias farmacêuticas e de cosméticos a demanda por matéria-prima desta espécie, com alta qualidade, aumenta a cada ano e conseqüente a isto, o aumento da oferta necessita de expansão nas áreas de cultivo. No cenário brasileiro atual, destaca-se a *A. vera* importada, onde a espécie é cultivada em propriedades de pequeno e médio porte, que são incapazes de fornecer matéria-prima em alta escala, deixando a demanda brasileira bem aquém quando comparada com a produção internacional. Neste contexto, a propagação vegetativa convencional não tem potencial suficiente para suprir a demanda do mercado, sendo considerada lenta e de baixo rendimento (Silva et al. 2007; Molsaghi et al. 2014).

A confiabilidade adquirida através da produção em larga escala de matéria-prima com qualidade, aliada ao cultivo *in vitro* de materiais isentos de patógenos, em um local controlado e acessível, facilitará sua multiplicação e uso sempre que necessário, contribuindo para o sucesso da cadeia produtiva dos fitoterápicos, que por sua vez apresentam menor custo a população em comparação aos sintéticos. Esta garantia otimizada colabora com a visão industrial de redução de custos e lançamentos de novos produtos em um curto período de tempo.

Logo, frente a esta perspectiva, o trabalho tem como objetivo conduzir experimentos visando avaliar a influência do seccionamento dos explantes para a *A. vera* submetida a multiplicação *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Biotecnologia Aplicada a Saúde da Faculdade Maria Milza (FAMAM), em Governador Mangabeira, Estado da Bahia. Como material

vegetal utilizou-se gemas axilares oriundas de plantas de babosa (*A. vera*) da família botânica Asphodelaceae, as plantas foram coletadas na região do Recôncavo da Bahia entre o período de 2015 e 2017.

As brotações de *A. vera* obtidas *in vitro* foram subcultivadas em meio de cultura MS (Murashige e Skoog 1962) com adição de 0,2 mg/l de ANA (Ácido naftalenoacético) e 2,0 mg/l de BAP (6-benzilaminopurina), 30 g/l de sacarose, 1,0 g/l de carvão ativado, solidificado com 6,5 g/l de ágar e pH ajustado em 5,8 anterior à autoclavagem. Após a inoculação, os frascos foram mantidos em sala de crescimento, com temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 16 h e 40 $\mu\text{M m}^2/\text{s}$ de intensidade luminosa.

Os brotos foram submetidos à multiplicação por meio de três repicagens sucessivas com intervalo de 30 dias de cultivo, nas mesmas condições descritas acima. Para tanto, a cada repicagem foram avaliadas as características: altura de planta (cm), número de brotos, número de folhas verdes, presença de folhas senescentes e presença de raiz.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3 x 2, sendo três subcultivos e dois tipos de explantes (seccionados e não-seccionados). Foram utilizadas 5 repetições por tratamento, sendo a unidade experimental representada por um frasco contendo três explantes com aproximadamente 1,0 cm de tamanho.

RESULTADO E DISCUSSÃO

Segundo a análise de variância (Tabela 1), a interação Subcultivo x Explante foi significativa para as variáveis de NB e NFV. Os subcultivos influenciaram no desenvolvimento de todas as características avaliadas nas plantas cultivadas *in vitro*. Entre os tipos de explantes foram observados

TABELA 1. Resumo da análise de variância para altura de planta (AP), em cm, número de brotos (NB) e número de folhas verdes (NFV) de plantas de *Aloe vera* proveniente de explantes não seccionados e seccionados cultivados *in vitro* em meio de cultura MS contendo 0,2 mg/l de ANA e 2,0 mg/l de BAP durante três subcultivos com intervalos de 30 dias cada.

	GL	AP	NB	NFV
Subcultivos (SUB)	2	3,16**	0,53**	2,25*
Explantes (EXP)	1	0,06 ^{ns}	0,32*	0,93*
SUB x EXP	2	0,36 ^{ns}	0,38**	1,76**
Erro	22	0,18	0,05	0,16
CV (%)		15,43	14,49	13,28
Média geral		2,76	2,13	8,73

**,* significativo a 1% e 5% de probabilidade pelo teste F. ^{ns} não significativo a 5% de probabilidade.

efeito significativo na formação de brotos, assim como no número de folhas verdes.

Em relação a AP (Tabela 2), observou-se que as plantas do terceiro subcultivo apresentaram as maiores médias. Quando se realizou o primeiro subcultivo, obteve-se média de 2,29 cm, no segundo 2,61 cm e no terceiro 3,42 cm de AP. Gomide (2004), ressaltou que as mudas de morangueiro submetidas a nove subculturas repetidas apresentaram maior altura que as mudas que foram submetidas a menos ciclos de subcultivo. Esclarece Fonseca et al. (2012), dizendo que a característica altura da planta pode ter sofrido variações por conta de uma possível seleção dos explantes mais vigorosos nos ciclos de subcultivos ou que os ciclos de subcultivos não tenham sido suficiente para assegurar a estabilidade fenotípica das plantas para característica AP.

Diferente do estudo em questão, Moura (2001) encontrou em sua pesquisa resultados, onde as brotações obtidas por meio dos explantes seccionados de laranja-‘Valência’ apresentaram menor altura, quando comparadas com os explantes não submetidos ao seccionamento. O mesmo autor resalta que tais resultados são consequência de uma maior competição nutricional no meio de cultivo, bem como a baixa reserva endógena de nutrientes do explante seccionado.

Os resultados da Tabela 3 demonstraram que as maiores médias do número de brotos foram alcançadas no terceiro subcultivo, principalmente quando os explantes foram seccionados (4,67).

Almeida et al. (2002), também observaram após 5 subcultivos que os explantes seccionados forneceram maior número médio de brotos por explante (613,7) em comparação com os explantes não-seccionado (69,1 brotos por explante). Frente a isto, os autores salientam que o corte longitudinal dos explantes provou ser uma estratégia muito eficiente para melhorar a multiplicação de brotos de abacaxi pérola.

TABELA 2. Valores médios de altura de plantas de *Aloe vera* (cm), cultivadas *in vitro* em meio de cultura MS contendo 0,2 mg/l de ANA e 2,0 mg/l de BAP durante três subcultivos com intervalos de 30 dias cada.

Subcultivos	Médias
1	2,29* b
2	2,61 b
3	3,42 a

*Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

TABELA 3. Valores médios do número de brotos de plantas de *Aloe vera*, provenientes de explantes não-seccionados e seccionados cultivados *in vitro* em meio de cultura MS contendo 0,2 mg/l de ANA e 2 mg/l de BAP durante três subcultivos com intervalos de 30 dias cada.

Subcultivos	Explantes	
	NS	S
1	1,40* aA	1,93 bA
2	1,80 aA	1,34 bA
3	2,00 aB	4,67 aA

*Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey (P<0,05) e médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste F (P<0,05).

De acordo com Cutter (1986), a prática do seccionamento em regiões meristemáticas e do parênquima combinada ao uso de citocininas como, por exemplo, o BAP, proporciona o estímulo da divisão celular. Assim, é provável que o seccionamento do explante realizado neste trabalho, combinado com a aplicação exógena de citocinina (BAP), tenha estimulado a divisão celular e, conseqüentemente, maior diferenciação de gemas adventícias, conduzindo ao maior número de brotações, quando comparado com os explantes não seccionados.

Nos estudos de Rescarolli e Zaffari (2009), a combinação de um fitorregulador da classe das citocininas com o seccionamento de *Etilingera elatior*, proporcionou a diminuição da dominância apical, que por sua vez estimulou a formação significativa de brotos.

Carvalho et al. (2000), com o intuito de aumentarem a multiplicação *in vitro* realizaram experimentos com explantes inteiros e seccionados de bananeira (*Musa* sp.), e concluíram que o maior valor médio do número de brotos por explante foi de 3,80 quando se utilizou explantes inteiros e com os explantes seccionados um valor médio de 2,85. Segundo os mesmos autores o corte dos explantes minimizou as reservas essenciais para a demanda de metabólitos participantes da diferenciação e brotação de gemas axilares. Por outro lado, salienta Zaffari et al. (1994), que o seccionamento dos explantes proporciona o aumento da superfície do tecido oxidado, reduzindo a absorção de nutrientes e hormônios pelos tecidos.

Os resultados demonstraram que as maiores médias do número de folhas verdes foram alcançadas no terceiro subcultivo, sendo que os explantes seccionados proporcionaram o maior valor

médio do NFV (17,42) nesse subcultivo (Tabela 4). A Figura 1 expõe a comparação visual das plantas de *A. vera* obtidas por meio de explantes não-seccionados e seccionados.

TABELA 4. Valores médios do número de folhas verdes de plantas de *Aloe vera*, provenientes de explantes não-seccionados e seccionados cultivados *in vitro* em meio de cultura MS contendo 0,2 mg/l de ANA e 2,0 mg/l de BAP durante três subcultivos com intervalos de 30 dias cada.

Subcultivos	Explantes	
	NS	S
1	5,26* bB	8,26 Ba
2	8,40 abA	5,40 bB
3	8,73 aB	17,42 aA

*Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ($P < 0,05$) e médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas linhas não diferem

estatisticamente entre si pelo teste F ($P < 0,05$).

No presente experimento, não foram evidenciadas, para ambos os tipos de explantes, a presença de folhas senescentes, independente do subcultivo realizado. Já em relação a presença de raízes (Tabela 5), o primeiro subcultivo apresentou as maiores porcentagens de enraizamento das plantas para ambos os tipos de explantes, sendo que o explante não-seccionado proporcionou maior porcentagem de enraizamento no primeiro subcultivo e nos subcultivos seguintes o explante seccionado exibiu maior porcentagem.

Foi perceptível que ambos os tipos de explantes apresentaram uma tendência de redução da porcentagem de enraizamento no decorrer dos subcultivos, conferindo que as repicagens não foram favoráveis para formação de raízes. Moura (2001), encontrou porcentagem de enraizamento de apenas 45% para plantas de *Citrus* com explantes seccionados, enquanto naquelas oriundas dos explantes não seccionados, este índice alcançou 80%. O autor atribui isso ao fato dos explantes seccionados terem limitada reserva endógena. Uma

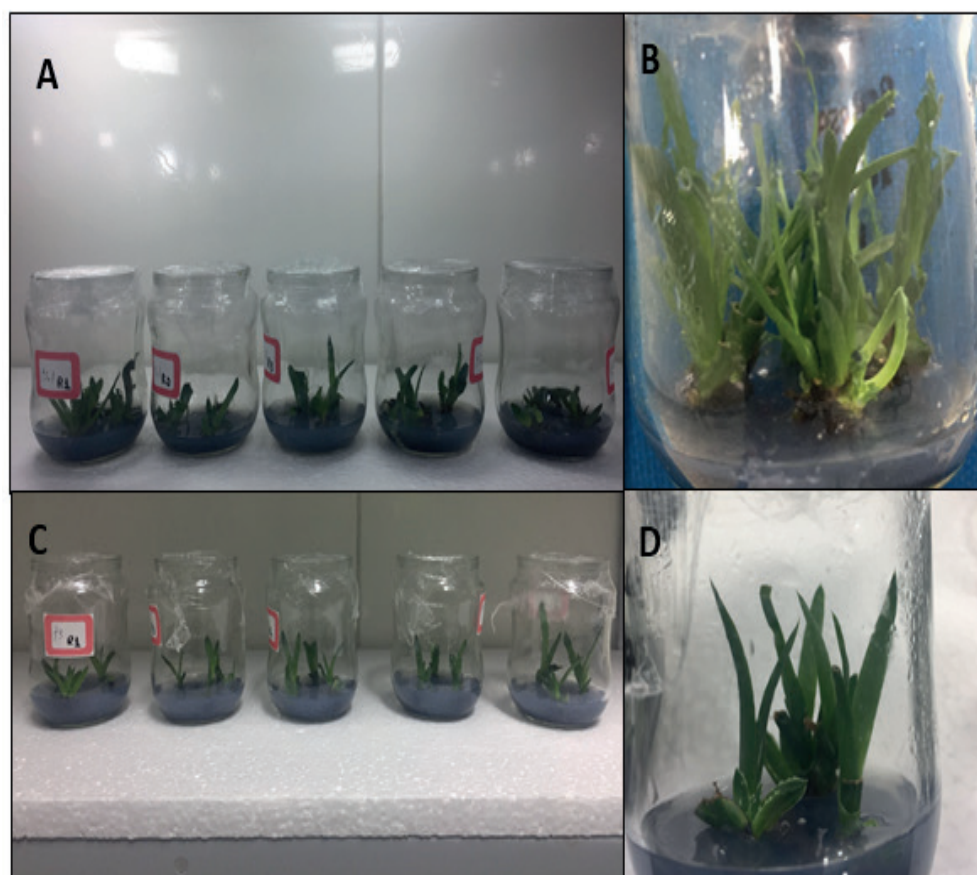


FIGURA 1. Plantas de *Aloe vera*, oriundas de explantes não-seccionados e seccionados cultivados *in vitro* em meio de cultura MS contendo 0,2 mg/l de ANA e 2 mg/l de BAP durante o terceiro subcultivo. A) Plantas oriundas de explantes seccionados após 10 dias de cultivo. B) Plantas oriundas de explantes seccionados após 30 dias de cultivo. C) Plantas oriundas de explantes não-seccionados após 10 dias de cultivo e D) Plantas oriundas de explantes não-seccionados após 30 dias de cultivo.

TABELA 5. Porcentagem de enraizamento de plantas de *Aloe vera*, provenientes de explantes não-seccionados e seccionados cultivados *in vitro* em meio de cultura MS contendo 0,2 mg/l de ANA e 2 mg/l de BAP durante três subcultivos com intervalos de 30 dias cada.

Subcultivos	Explantes	
	NS	S
1	100%	60%
2	40%	50%
3	40%	50%

vez que, o enraizamento pode ser desencadeado através do balanço endógeno em favor da auxina ou pela presença de cálcio, boro e zinco no meio de cultivo MS, já que esses nutrientes são conhecidos como rizogênicos (De Fossard et al. 1977; Andersen 1986).

No trabalho de Oliveira (2017), os subcultivos realizados em *Cedrela fissilis* comprometeu o enraizamento das brotações obtidas, onde observou-se uma redução significativa no desenvolvimento das raízes. O autor relata que o baixo índice de formação de raízes nas brotações ao longo dos subcultivos em *C. fissilis* pode apresentar relação com a alteração hormonal endógena de auxina e citocinina nas brotações oriundas de segmentos nodais apicais e cotiledonares. Frente a isto, corroboram Noiton et al. (1992), Fleck et al. (2009) e Costa et al. (2013), dizendo que dentre os fatores que influenciam a competência para o enraizamento, ressalta-se a excisão adequada da base da brotação, com o intuito de manter a integridade dos tecidos no local de indução de raízes, sendo isto primordial para as respostas a estímulos externos e internos durante a formação das raízes. Enquanto Noiton et al. (1992) e Moubayidin et al. (2009), citam que a privação da competência de regeneração de raízes pode ter ligação com o balanço inadequado de auxina e citocinina endógenas nas brotações.

CONCLUSÃO

De acordo com experimentos realizados neste trabalho, pode-se concluir que o seccionamento dos explantes combinado com a realização de subcultivos promoveu as melhores respostas de NB e NFV, provando ser um método eficiente para a multiplicação *in vitro* de plantas de babosa.

REFERÊNCIAS

Almeida WAB, Mourão Filho, FDAA, Mendes BMJ, Rodriguez APM (2002) *In vitro* organogenesis

- optimization and plantlet regeneration in *Citrus sinensis* and *C. limonia* Sci Agric 59: 35-40.
- Andersen AS (1986) Environmental influences on adventitious rooting cuttings of non-woody species. In: Jackson MB (Ed.) *New root formation in plants and cutting* Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers. 223-253.
- Brasil (2012a) Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. *Relação Nacional de Medicamentos Essenciais: RENAME 2012*. Brasília: Ministério da Saúde.
- Carvalho ACPP, Costa AMG, Santos MRA (2006) Efeito do tipo de incisão sobre a dominância apical em ápices caulinares em duas cultivares de bananeira (*Musa sp.*). *Plant Cell Cult Micropropag* 2: 48-52.
- Costa CT, De Almeida MR, Ruedell CM, Schwambach J, Maraschin FDS, Fett-Neto, AG (2013) When stress and development go hand in hand: main hormonal controls of adventitious rooting in cuttings. *Front Plant Sci* 4: 133.
- Cutter EG (1986) *Anatomia Vegetal: células e tecidos*. São Paulo: Roca. 304p.
- De Fossard RA, Baker PK, Bourne RA (1977) The organ culture of nodes of four species of *Eucalyptus*. *Acta Hort* 78: 157-165.
- Fonseca AP, Silva ECD, Pereira MB, Oliveira RPD, Dornelles ALC (2013) Estabilidade fenotípica de genótipos de morangueiro submetidos a número variável de subcultivos *in vitro*. *Ciênc Rural* 43: 1345-1350.
- Gomide DG (2004) Influência do número de subcultivos na multiplicação *in vitro* e na aclimatização de plantas micropropagadas de morangueiro. 93p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, Brasil.
- Molsaghi M, Moieni A, Kahrizi D (2014) Efficient protocol for rapid *Aloe vera* micropropagation. *Pharm Biol* 52: 735-739.
- Moubayidin L, Di Mambro R, Sabatini S (2009) Cytokinin–auxin crosstalk *Trends Plant Sci* 14: 557-562.
- Moura TL, Almeida WABD, Mendes B, Januzzi M, Mourão Filho FDAA (2001) Organogênese *in vitro* de *Citrus* em função de concentrações de BAP e seccionamento do explante. *Rev Bras Frutic* 23: 240-245.
- Ni Y, Turner D, Yates KÁ, Tizard I. (2004) Isolation and characterisation of structural components of *Aloe vera* L. leaf pulp. *Int Immunopharmacol* 4: 1745–1755.
- Nointon D, Vine JH, Mullins MG (1992) Effects of serial subculture *in vitro* on the endogenous levels of indole-3-acetic acid and abscisic acid and rootability in microcuttings of 'Jonathan' apple. *Plant Growth Regul* 11: 377-383.
- Oliveira T R (2017) Influência dos subcultivos e da qualidade da luz na morfogênese *in vitro* em *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae). 112p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal), Universidade Federal do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, Brasil.
- Rescarolli CLS, Zaffari GR (2009) Produção de mudas de *Etilingera elatior* (Jack) R.M. Sm. Através da cultura de tecidos vegetais *in vitro*. *Rev Bras Plantas Med* 11: 190-195.
- Silva CG, Debiasi C, Pescador R (2007) Enraizamento

- in vitro* e aclimatização de mudas micropropagadas de *Aloe vera* L. Rev Bras Plantas Med 9: 29-35.
- Talmadge J, Chavez J, Jacobs L, Munger C, Chinnah T, Chow JT, Yates, K (2004) Fractionation of *Aloe vera* L. inner gel, purification and molecular profiling of activity. Int. Immunopharmacol 4: 1757-1773.
- Zaffari GR, Soliman Filho LF, Stuker H (1994) Efeito do tamanho do explante e da quebra da dominância apical, sobre a brotação das gemas laterais na produção de mudas de bananeira, *in vitro*. Rev Bras Frutic 16: 71-76.