

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM FISILOGIA VEGETAL



DISSERTAÇÃO

**UTILIZAÇÃO DE BIORREATORES DE IMERSÃO TEMPORÁRIA NA
MICROPROPAGAÇÃO DE BATATA-DOCE**

MANOEL URBANO FERREIRA JÚNIOR

PELOTAS, 2015

MANOEL URBANO FERREIRA JÚNIOR

**UTILIZAÇÃO DE BIORREATORES DE IMERSÃO TEMPORÁRIA NA
MICROPROPAGAÇÃO DE BATATA-DOCE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Fisiologia Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. José Antônio Peters

Co-Orientador: Prof. Dr. Leonardo Ferreira Dutra

Pelotas, 2015

Dados de catalogação na fonte:

Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/901

Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

F383u Ferreira Júnior, Manoel Urbano

Utilização de biorreatores de imersão temporária na micropropagação de batata-doce / Manoel Urbano Ferreira Júnior. – 49f. : il. – Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Pelotas. Instituto de Biologia. Pelotas, 2015. – Orientador José Antônio Peters ; coorientador Leonardo Ferreira Dutra.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. José Antônio Peters – Orientador

Prof^a. Dr^a Eugênia Jacira Bolacel Braga

Dr^a Daiane de Pinho Benemann

Dedicatória

A família, por ter suportado a ausência
neste período de total entrega.

Agradecimentos

Da mesma forma que em qualquer grande empreendimento a que nos propomos, sem a ajuda de outrem é quase impossível alcançar os objetivos. Nesta etapa não foi diferente. Inicio os agradecimentos pelo co-orientador e amigo, Leonardo Dutra, que além de acolher a ideia, incentivou e acabou sendo um dos responsáveis por nossa vinda; ao amigo José Barbosa Cabral, outro intermediário desta empreitada; ao IPA, através da pessoa de seu Ex-diretor Presidente, Dr. Júlio Zoé. Em especial, um agradecimento fraterno ao colega Pablo Machado, pesquisador do INICA, Cuba, principal responsável por nossa inserção no mundo da cultura de tecidos de plantas e principalmente na imersão temporária e aos inumeráveis amigos cubanos.

Não foi fácil sair de casa e deixar a família a mais de três mil quilômetros. Porém, o apoio recebido nesta instituição pelos professores, funcionários e colegas, tornou este fardo menos pesado. Todos tiveram uma participação importante no nosso acolhimento e adaptação. Destacamos a pessoa do Víctor Mouzinho, como um dos primeiros contatos e que se mantem. Durante o período de disciplinas, várias colegas foram fundamentais com sua paciência e dedicação. E, em nome da Vânia Trevelin, eu gostaria de agradecer às demais.

Ao nos confinarmos no laboratório, nossos laços se estreitam e daí surgem as afinidades e divergências. As colegas de curso que se mantiveram em trabalho conjunto no laboratório, todas, sem exceção, foram ótimas companheiras de trabalho. Cito a princípio Daiane Tereza Silva e Mara Cíntia Winhelmann, porque foram as primeiras a nos deixar. Em seguida a Camila Fernanda de Oliveira Junkes com seus questionamentos sapientíssimos e instigantes. Por fim às que continuam: Alírcia Kleinowski, Cristina Weiser Ritterbusch e Natália Dias Gomes da Silva, além das que iniciam, Cristini Milech e Simone Lucho.

Finalmente, àquele que acreditou e tornou este sonho possível, Prof. José Antônio Peters, por sua dedicação, paciência, companheirismo e espírito paternal, meu MUITO OBRIGADO!

Nunca te é concedido um desejo sem que te seja concedida também a faculdade de torná-lo realidade. Entretanto, é possível que tenhas que lutar por ele.

Richard Bach

RESUMO

FERREIRA JÚNIOR, Manoel Urbano. **UTILIZAÇÃO DE BIORREATORES DE IMERSÃO TEMPORÁRIA NA MICROPROPAGAÇÃO DE BATATA-DOCE.** 2015. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS.

A utilização da técnica de micropropagação de plantas tornou-se uma ferramenta comum entre os produtores de plantas certificadas. Porém ainda se utiliza o sistema de micropropagação convencional de forma ampla sem se dar a devida importância ao sistema de imersão temporária (SIT). O objetivo do presente trabalho é apresentar uma alternativa de diminuição dos custos de produção e simplificação dos trabalhos de plantas *in vitro*, através da montagem e utilização de biorreatores de imersão temporária e utilização de um novo modelo de válvula duplo solenoide de cinco vias de centro aberto negativo. No presente trabalho, apresenta-se um modelo de SIT, construído de forma artesanal, que quando comparado a equipamentos similares manufaturados apresenta resultados de produtividade equivalente provando ser um equipamento de grande utilidade na automação para produção de plantas *in vitro*. Ao mesmo tempo, desenvolveu-se um microbiorreator, utilizando recipientes de vidro com pequena capacidade, com a finalidade de se trabalhar materiais vegetais com pouca disponibilidade de explantes, o qual poderá ser utilizado em pesquisa científica, com sucesso, conforme corroborado em trabalhos preliminares com as culturas de amora-preta, framboesa e macieira. A principal espécie vegetal utilizada nos experimentos com os biorreatores, batata-doce, apresenta um grande apelo popular devido a sua contribuição alimentar como fornecedora de carboidratos, aminoácidos e vitaminas e não tinha ainda sido testada neste sistema de micropropagação. Os resultados obtidos com os biorreatores foram similares às taxas de multiplicação em sistema convencional, demonstrando que os protocolos para utilização do SIT precisam ser otimizados, principalmente quanto ao tempo e número de imersões, composição dos meios de cultura e densidade de fluxo de fótons. No sistema convencional, não foi observado influência diferencial entre as lâmpadas fluorescentes branca-fria e LED e $7,5\text{g L}^{-1}$ de sacarose apresentou resultado similar a 15 e 30g L^{-1} nas variáveis estudadas, indicando que esta espécie é pouco exigente quanto a adição externa de açúcares no meio de cultura, sendo talvez um material vegetal indicado para estudos de micropropagação fotoautotrófica. Finalmente, o equipamento agora disponível no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas da UFPel poderá ser utilizado no desenvolvimento de novas pesquisas científicas relacionadas à fisiologia, anatomia e produção de metabólitos secundários.

Palavras-chave: Meios de cultura, automação, fontes de luz, enraizamento.

ABSTRACT

FERREIRA JÚNIOR, Manoel Urbano. **UTILIZATION OF TEMPORARY IMMERSION BIOREACTOR IN MICROPROPAGATION OF SWEET POTATO.** 2015. Dissertation (Master's degree in Plant Physiology) – Post-Graduate Program in Plant Physiology, Institute of Biology, Federal University of Pelotas, Pelotas/RS.

The use of plant micropropagation technique has become a common tool between producers of certified plants. But the conventional micropropagation system is still broadly used without giving due importance to the temporary immersion system (TIS). The objective of this study is to present a cheaper alternative production costs and simplification of in vitro plants of work, through the assembly and use of temporary immersion bioreactors and use of a new double solenoid valve model five open center routes negative. In this study, we present a model of TIS, built by hand, that when compared to similar manufactured equipment showed results with equivalent productivity, proving to be a very useful equipment in automation for production of in vitro plants. At the same time, we developed a microbiorreactor using glass containers of small capacity, in order to work with low availability of vegetal material explants, which can be used for scientific research successfully, as confirmed in preliminary studies with cultures of blackberry, raspberry and apple. The main plant specie used in this experiments with the bioreactor, sweet potato, has great popular appeal due to its contribution as a supplier of food carbohydrates, amino acids and vitamins and had not yet been tested in this micropropagation system. The results obtained with multiplication in bioreactors were similar to rates in conventional system, showing that the use of TIS protocols must be optimized, especially with regard to the time and number of immersion, composition of culture media and photon flux density. With the conventional system, there wasn't observed influence differential between white-cold fluorescent lamps and LED and 7.5 g L⁻¹ sucrose showed a similar result to 15 and 30 g L⁻¹ in the variables studied, indicating that this species is not very exigent about external addition of sugars in the culture medium, and perhaps it could be a plant material suitable for studies of photoautotrophic micropropagation. Finally, the equipment now available in Plant Culture Laboratory may be used in the development of new scientific research related to physiology, anatomy and production of secondary metabolites.

Keywords: Culture media, automation, light sources, rooting.

Lista de Figuras

Figura 1. Apresentação do desenho atual de SIT destacando válvulas solenoides de via única e tubulações de metal (A) e poliuretano (B).....	29
Figura 2. Visualização da estante de SIT na sala de crescimento do Laboratório de Cultura de Plantas/UFPel, destacando a válvula duplo solenoide de 5/3 vias (A) e duas válvulas montadas (B).....	30
Figura 3. Visualização dos SIT de garrafões PET (A) e de policarbonato da empresa RALM (B).....	31
Figura 4. Visualização de microbiorreatores em teste (A) e com cultivo piloto de amora-preta (B).....	32
Figura 5. Comprimento de plantas de batata-doce, cv. BRS-Cuia, desenvolvidas em meio de cultura MS com diferentes concentrações de sacarose no sistema convencional.....	35
Figura 6. Número de gemas de plantas de batata-doce, cv. BRS-Cuia, cultivadas em meio MS com diferentes concentrações de sacarose e fontes de luz, em sistema convencional.....	36.
Figura 7. Visualização de plantas de batata-doce postas à aclimatização em seguida à coleta (A) e após 21 dias de aclimatização (B).....	37

Lista de Tabelas

Tabela 1. Comprimento médio de brotações, número de gemas axilares e número de brotações por planta aclimatizável de batata-doce desenvolvidas em sistema convencional (SC) e sistema de imersão temporária (SIT) por 28 dias.....	33
Tabela 2. Médias de comprimento, número de gemas e número de brotos de plantas de batata-doce cv. BRS-Cuia cultivadas em SIT montados com garrafas PET e policarbonato.....	34
Tabela 3. Percentagem de aclimatização de três cvs. de plantas de batata-doce, desenvolvidas em SIT e transferidas para casa de vegetação durante 21 dias.....	37

Sumário

Resumo.....	07
Abstract.....	08
Lista de Figuras.....	09
Lista de Tabelas.....	10
Introdução.....	12
Objetivos.....	20
Material e Métodos.....	21
Material vegetal.....	21
Metodologia.....	22
Estabelecimento <i>in vitro</i>	22
Multiplicação do material inicial.....	23
Montagem do Sistema de Imersão Temporária (SIT).....	23
Experimentos com batata-doce.....	24
Aclimatização.....	28
Resultados.....	28
Montagem do Sistema de Imersão Temporária (SIT).....	28
Experimentos com batata-doce.....	32
Discussão.....	38
Conclusões.....	41
Referências.....	42
Considerações Finais.....	49

INTRODUÇÃO

Os pioneiros da cultura de tecidos vegetais buscavam ferramentas que os ajudassem no entendimento quanto à morfogênese e pudessem demonstrar a teoria da totipotência de Hamberlandt, como citam Krikorian e Berquam (1969), não imaginando que a técnica pudesse se transformar em uma atividade voltada para o setor de agronegócios (MURASHIGE, 1974).

A cultura de tecidos é uma ferramenta biotecnológica que oferece vantagens na propagação de diversas espécies e engloba diferentes técnicas de cultivo em meio nutritivo de células, tecidos ou órgãos de plantas, sob condições assépticas e densidade de fluxo de fótons, fotoperíodo e temperatura controlados, dentre outros fatores (CARVALHO et al., 2011). Esta tecnologia pode ser utilizada para conservação e intercâmbio de germoplasma *in vitro*; recuperação de híbridos interespecíficos provenientes de cruzamentos com incompatibilidade pós-zigótica; produção de haploides e duplo-haploides; produção de metabólitos secundários, indução de variabilidade genética, transformação genética e, principalmente na multiplicação rápida (micropropagação) e em escala comercial de plantas livre de doenças (SANTA-MARIA et al., 2009; MISHRA et al., 2011; REY et al., 2012; WANG e WANG, 2012; ASGHARI et al., 2013; FEHE'R-JUHA'Sz et al., 2014).

A micropropagação, além das potencialidades acima citadas, também possibilita, dependendo do explante inicial, a manutenção das características genéticas das plantas matrizes. O explante mais adequado, em função de suas características fisiológicas e morfológicas, é o “meristema”. O meristema é um tecido formado por células tronco pluripotentes e não diferenciadas, envolvido na síntese protoplasmática e formação de novas células por divisão mitótica (CARVALHO et al., 2011). Além disso, a região meristemática não apresenta ligação direta com os feixes vasculares da planta-matriz, o que possibilita a obtenção de plantas livres de doenças, principalmente viroses (ALAM et al., 2013; SASTRY e ZITTER, 2014). No entanto, outros explantes podem ser utilizados na micropropagação de plantas, como ápices caulinares (segmento do ápice do caule), composto pelo meristema apical (0,05 - 0,1 mm) juntamente

com os primórdios foliares e folhas em desenvolvimento e gemas axilares (ASGHARI et al., 2013; BANDEIRA et al., 2013).

Segundo George e Debergh (2008), a micropropagação é dividida basicamente em quatro etapas: estabelecimento de cultura *in vitro*; multiplicação das brotações; alongamento/enraizamento de microestacas e aclimatização. No primeiro estágio explantes são coletados e transferidos para cultura *in vitro* após desinfestação superficial. O sucesso desta etapa está relacionado a fatores como condições de desinfestação, época de coleta, estado nutricional da planta-matriz, meio de cultura, ocorrência de oxidação dos explantes e exposição à luz/escuro (GEORGE e DEBERGH, 2008; DOBRÁNSKI e SILVA, 2010).

A fase de multiplicação tem como objetivo a obtenção de maior número possível de brotações a partir de subculturas sucessivas. Nesta etapa da micropropagação é de fundamental importância a definição de protocolos eficientes quanto à composição mineral do meio, conteúdo e concentração de reguladores de crescimento, principalmente de citocininas e suas relações com as auxinas, intensidade luminosa, temperatura ou umidade relativa (BHATTI e JHA, 2010). Algumas espécies exigem altas concentrações de citocininas para a diferenciação de novas brotações, embora, dependendo destas, possam causar inibição do seu alongamento (ZHU et al., 2005). Em função deste fato, por vezes se faz necessária a inserção de uma fase de alongamento das brotações pela adição de giberelinas, antes de passá-las para a etapa de enraizamento (DOBRÁNSKI e SILVA, 2010).

Na fase de enraizamento a formação de um sistema radicular adequado nas brotações, é uma condição essencial, a fim de permitir maior adaptação ao ambiente externo. Sua eficiência se relaciona com a redução nos teores de citocininas e adição de auxinas ou carvão ativado ao meio de cultura (DOBRÁNSKI e SILVA, 2010).

A aclimatização corresponde à fase de transferência de brotações enraizadas ao ambiente natural, etapa crucial e decisiva para o uso comercial da micropropagação. Por isso, durante a aclimatização é necessário manter uma diminuição gradual da umidade e aumento concomitante da intensidade

da luz, a fim de evitar uma perda significativa de material devido a dificuldades na adaptação das plantas (DOBRÁNSKI e SILVA, 2010; MUNIZ et al., 2013).

A tecnologia da micropropagação apresenta, dependendo do genótipo, muitas vantagens em relação aos métodos tradicionais de propagação, principalmente quanto à eliminação de doenças e fidelidade genética relatada anteriormente. Além destas, a técnica destaca-se por requerer pouco espaço físico e poder ser realizada durante todo o ano, independente da estação (COUTO, 2003). No entanto, apresenta algumas desvantagens, como: necessitar de instalações especializadas e caras, utilizar grande quantidade de mão de obra e provocar alterações fisiológicas/morfológicas das plantas induzidas *in vitro* em função do desenvolvimento em meio nutritivo contendo sacarose ou outra fonte de carbono, bem como níveis relativamente elevados de reguladores de crescimento. Tais condições determinam a formação de plantas alteradas estrutural e fisiologicamente, como baixa taxa fotossintética, mal funcionamento dos estômatos e diminuição da cera epicuticular que, tornam as plantas, entre outros aspectos, mais suscetíveis à perda de água durante a aclimatização (HAZARIKA, 2006; GEORGE e HALL, 2008).

Para o sucesso do processo da micropropagação de qualquer espécie ou cultivar, um dos aspectos mais importantes está relacionado ao meio de cultura a ser utilizado (ERIG et al., 2004; DOBRÁNSZKI e SILVA, 2010). Segundo Torres et al. (2001), os principais componentes são água, sais inorgânicos, carboidratos, vitaminas e reguladores de crescimento, em vista que os explantes estão normalmente submetidos a um ambiente heterotrófico e/ou mixotrófico requerendo assim meio nutritivo para suplementar suas necessidades exógenas, em termos de elementos essenciais, constituintes orgânicos e energia (GAMBORG et al., 1976). Assim, pesquisas têm sido realizadas visando otimizar as necessidades de plantas específicas, determinando como consequência a formulação de vários meios de cultura com composições e concentrações diferentes de compostos minerais e orgânicos, como MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), B5 (GAMBORG e SHYLUK, 1970), SH (SHENCK e HILDERBRANDT, 1972) e WPM (LOYD e McCOWN, 1980), entre os mais amplamente utilizados (GAMBORG et al., 1976; MADKE et al., 2014).

Os trabalhos pioneiros na área de cultura de tecidos utilizavam nos meios de cultura algum tipo de agente gelificante, a fim de torná-lo semissólido (GEORGE e HALL, 2008). Dentre estas substâncias, a mais conhecida e utilizada é o ágar, um hidrocoloide extraído de algas marinhas vermelhas e composto por dois polissacarídeos, agarose e agarpectina (CARVALHO et al., 2011). A utilização de ágar no meio semissólido, além de proporcionar sustentação para o explante, também tem efeito sobre a absorção de nutrientes, no crescimento e características das brotações/plantas, como por exemplo reduzir/induzir a hiperidricidade (PEREIRA-NETO et al., 2007). Baixa concentração deste gelificante, ou seja, redução da resistência à difusão de sais e alto potencial hídrico, pode resultar na intensificação desta anomalia (ARAGON et al., 2014). Outro aspecto a considerar em relação ao ágar é que ele não é um produto fisiologicamente inerte, podendo fornecer quantidades variáveis de substâncias estimulantes e/ou inibidoras ao crescimento (POWELL e UHRIG, 1987; GEORGE e HALL, 2008). Assim, a multiplicação convencional (meio semissólido) é limitada na produção comercial de diversas espécies de plantas devido à elevada demanda de trabalho manual, baixas taxas de crescimento, exsudatos tóxicos dos explantes que não se difundem de forma rápida, baixa difusão de oxigênio nas raízes, custo adicional do gelificante e baixo grau de automação (CHU, 1995).

Além do ágar, outros agentes gelificantes também têm sido utilizados mais recentemente, como o Gelrite (Kelco Division, Merck & Co.) e Phytigel (Sigma Chemical Co.). Estes produtos são polissacarídeos naturais produzidos pela bactéria *Pseudomonas elodea* que agem como agente gelificante na presença de cátions. Eles têm como unidade repetitiva um tetrassacarídeo composto de duas unidades de D-glicose, um resíduo de L-ramnose e de ácido D-glucurônico (DEA, 1989). Como vantagem, apresentam um gel mais translúcido, possibilitando a detecção de infecções na cultura com maior facilidade. Por outro lado, apresentam uma tendência para indução de maior hiperidricidade das brotações quando comparado ao ágar (PASQUALETO et al., 1986).

Uma alternativa aos meios semissólidos é o sistema de meios líquidos (ZIV, 2000), desenvolvidos principalmente para cultivo de células em

suspensão (FEI e WEATHERS, 2014). Posteriormente foram utilizados para cultivo de anteras, que frequentemente flutuam neste sistema de cultivo e, de protoplastos, que se desenvolvem em finas camadas de líquido estático, possibilitando adequada difusão gasosa (IMMONEN e ANTTILA, 2000; GROSSER e GMITTER JR., 2011). Os meios líquidos podem também ser utilizados na micropropagação em massa e substituir parcial ou totalmente o ágar, o qual representa aproximadamente 90% do custo de produção do meio de cultivo (GEORGE e HALL, 2008). Os meios líquidos são, principalmente, de dois tipos: estacionários ou com agitação (SCHERER et al., 2013). Normalmente nos meios líquidos estacionários, muito utilizados na etapa inicial da micropropagação de espécies sensíveis ao ágar, são usados pontes de papel, sobre os quais são colocados os explantes, normalmente representados por meristemas (ZOBAYED et al., 2000).

O uso do meio líquido sob agitação resulta frequentemente em taxas mais rápidas de crescimento quando comparado a meio semissólido (JIMÉNEZ et al., 1999). Isto ocorre devido a maior área de contato entre o meio e a superfície do explante e redução dos gradientes de nutrientes e gases entre o meio e o explante (ROELS et al., 2005), tornando mais eficiente a absorção dos constituintes do meio. No entanto, a principal desvantagem deste sistema de cultivo é induzir hiperidricidade das brotações, resultando em plantas mal formadas as quais não sobrevivem à aclimatização (HAZARIKA, 2006; TEIXEIRA DA SILVA et al., 2013).

Mais recentemente e com o objetivo de minimizar os problemas dos meios líquidos, foram desenvolvidos os sistemas de imersão periódica dos cultivos, denominados de sistema de imersão temporária (SIT), no qual vasos estáticos, contendo os explantes, recebem periodicamente ou temporariamente meios de cultivo (ETIENNE e BERTHOULY, 2002). Neste sistema o meio é bombeado de um reservatório para o frasco de cultivo em intervalos determinados experimentalmente e repetidos em um ciclo de 24 horas. Este sistema previne a anoxia, característica dos meios líquidos e tem a vantagem de o meio ser facilmente trocado (GEORGIEV et al. 2014; WILKEN et al., 2014).

A utilização de biorreatores, que segundo Teixeira (2002), podem ser conceituados como equipamentos para cultivo sob imersão temporária ou permanente de células, gemas, embriões ou qualquer tipo de propágulo que possa ser utilizado na micropropagação pode proporcionar uma ferramenta promissora para propagação clonal massal (LORENZO et al., 1998; TEISSON e ALVARD, 1999; ESCALONA et al., 1999; ETIENNE e BERTHOULY, 2002), principalmente em comparação ao sistema tradicional em meio semissólido. Suas vantagens são: a) produção de um grande número de plantas, principalmente devido às condições de cultura mais uniformes, maior espaço disponível e facilidade com a qual os explantes/brotações podem absorver nutrientes; b) redução do tempo no manejo das culturas, em razão da operação semiautomática e conseqüente economia de trabalho; c) melhor crescimento e produção de biomassa devido à boa aeração por fornecimento de oxigênio forçado e; d) redução da dominância apical e maior estímulo do crescimento de brotos laterais, durante seu desenvolvimento *in vitro* (ZHU et al., 2005).

Tais resultados (aumentos das taxas de multiplicação, matéria fresca e seca, melhor qualidade das brotações) estão associados à diminuição da hiperhidricidade quando o sistema está bem ajustado (ETIENNE e BERTHOULY, 2002; ROELS et al. 2005). A redução desta anomalia fisiológica (CARVALHO et al., 2011) está diretamente relacionada à renovação de ar no interior dos frascos de cultura (ROELS et al, 2005), prevenindo a acumulação de gás carbônico e etileno que ocorre na parte superior do meio estacionário e que tem efeitos prejudiciais sobre as brotações. Além disso, o ar interno dos frascos pode ser enriquecido com CO₂ (WATT, 2012).

Outro aspecto a salientar é que a troca de meio nas diferentes fases de cultivo não exige manuseio dos explantes como acontece no sistema convencional. Apenas o recipiente que contém o meio de cultivo é substituído, em câmara de fluxo, sem que aconteça qualquer manuseio com as plantas que se encontram no recipiente gêmeo (PAEK et al., 2001). Finalmente, a grande vantagem do SIT, é a diminuição de custos de produção, devido ao menor uso de mão-de-obra. Acredita-se que o SIT torne-se o método do futuro em micropropagação de plantas (WILKEN et al., 2014), embora ainda existam alguns problemas com a técnica (GEORGIEV et al., 2014). Dentre os

problemas e desvantagens do SIT, pode-se incluir a perda de grandes volumes de material quando ocorre contaminação e o alto investimento inicial (GERALD, 2011). Além disso, o controle da hiperhidricidade deve ser levado em consideração, pois frequências em imersões muito próximas e tempos longos de imersão também podem provocar esta desordem fisiológica em muitos cultivos (CHAKRABARTY et al., 2005; QUIALA et al., 2012).

Os sistemas de imersão temporários pioneiros foram desenhados para o desenvolvimento de células e embriogênese somática (TAKAYAMA e MISAWA, 1981; BIENIEK et al., 1995). Eram aparelhos muito grandes, dispendiosos, com uma complexidade de operação extrema, inibindo sua utilização entre os laboratórios mais simples. A partir da idealização dos modelos de vasos gêmeos interligados, a prática da micropropagação em escala comercial tornou-se viável (ESCALONA et al., 1999). Ainda assim, o material construtivo utilizado na época, vidro e conexões de cobre, dificultavam sua operacionalidade. O surgimento dos recipientes em materiais plásticos transparentes resistentes à autoclavagem diminuiu bastante a distância entre os produtores comerciais e os laboratórios de pesquisa. Por fim, a utilização de recipientes descartáveis, como garrafas PET, tubos de silicone e sacos plásticos, tem tornado a produção em massa de plantas *in vitro* uma realidade (DUCOS et al., 2008).

Um aspecto a ser salientado é que para a maioria dos cultivos, a utilização de biorreatores nas biofábricas comerciais é realizada somente na fase final ou último subcultivo para as fases de multiplicação e alongamento/enraizamento (TEIXEIRA e CID, 2010). Normalmente nos biorreatores comerciais são utilizados frascos de 5 até 20 litros que necessitam de um número relativamente grande de explantes, que muitas vezes não estão disponíveis, principalmente quando do início do desenvolvimento de protocolos de multiplicação. Assim o emprego de biorreatores de menor capacidade (microbiorreatores) pode ser útil para as primeiras observações no desenvolvimento e adaptação de protocolos, além de estudos fisiológicos específicos como metabólitos secundários, restrição nutricional e fotossíntese.

Finalmente, vale salientar que todos os sistemas de cultivo discutidos acima, são sistemas heterotróficos e/ou mixotróficos, que necessitam da adição de açúcares aos meios de cultivo (KOZAI, 1991), pois explantes clorofilados, brotações e plantas *in vitro* embora possuindo capacidade fotossintética para desenvolver a fotoautotrofia, sua atividade fotossintética é restrita amplamente pela baixa concentração de CO₂ nos vasos de cultivo, durante o fotoperíodo, e em parte pela presença de açúcar no meio (KOZAI et al., 2005). Assim, o aumento da concentração de CO₂ no interior dos frascos, concomitantemente com o aumento do fluxo de fótons nas câmaras de crescimento e a retirada de açúcares do meio, possibilitaria um avanço significativo na produção de plantas *in vitro*, pois evitaria alguns dos problemas inerentes aos sistemas de cultura tratados nas páginas anteriores, inclusive nos SITs. Talvez num futuro próximo isto possa ser realizado com uma gama significativa de espécies.

Em relação ao material vegetal a ser estudado, a batata-doce (*Ipomoea batatas* L.) é um dos principais cultivos alimentares, ainda pouco explorado, que ocupa hoje a sétima posição no mundo em se tratando de produção total, com um volume de 110,75 milhões de toneladas. A China é o maior produtor mundial com 79,1 milhões de toneladas, enquanto o Brasil figura na vigésima posição, com 480 mil toneladas (FAOSTAT, 2012). Internamente, o Estado do Rio Grande do Sul aparece como principal produtor nacional com 166 mil toneladas (IBGE, 2013).

Dentre suas qualidades, a batata-doce apresenta alta produtividade, baixo investimento agrícola e riqueza de nutrientes, principalmente em carboidratos tornando-a um dos pilares alimentícios para milhões de pessoas no mundo, em particular nos países em desenvolvimento (CASTRO et al., 2012). Alam (2013) citando Woolfe (1992) destaca a comprovada qualidade de precursores de vitamina A presentes na batata-doce de polpa amarela, o que torna este cultivo uma solução imediata no combate à sua deficiência na África, em especial na região ao sul do Saara. Vale também salientar que esta espécie apresenta resistência à seca, é de fácil cultivo, apresenta baixo custo de produção, possibilitando colheita prolongada, é mecanizável, e devido a sua ampla folhagem e sistema radicular proporciona proteção ao solo (SILVA et al., 2004). Além disso, a cultura da batata-doce insere-se como matéria prima para

obtenção de etanol por apresentar alto teor de amido, desde que apresente uma boa produtividade para que possa competir economicamente com outras culturas agroenergéticas (CASTRO et al., 2012). O álcool da batata-doce é um produto de alto valor agregado destinado à fabricação de bebidas, cosméticos, tintas e remédios (CASTRO et al., 2008).

A cv. BRS-Cuia, selecionada e introduzida desde o ano de 1994 junto ao Banco Ativo de Germoplasma da EMBRAPA Clima Temperado e avaliada anualmente em competições de campo em áreas experimentais e em propriedades de produtores, apresenta boas características de mercado e potencial produtivo, com produtividade média de 40t/ha, chegando a 60t/ha quando as condições são favoráveis. Apresenta também características químicas favoráveis, como alto teor de amido, podendo ser utilizada para a produção de etanol (Castro et al., 2012).

A cv. BRS-Rubissol foi selecionada a partir de plantas provenientes da região de Pelotas e mantida em Banco Ativo de Germoplasma desde o ano de 1994, tem sido avaliada anualmente tanto em unidades experimentais como em vários agricultores da região. Produz em média 40t/ha em área experimental e apresenta excelentes características para consumo de mesa e também pode ser utilizada no processamento industrial. Apresenta como diferencial, a coloração púrpura da casca e polpa levemente amarelada quando crua. Muito doce e com textura farinácea quando cozida (CASTRO et al., 2011a).

Por fim, a cv. BRS-Amélia, selecionada a partir plantas provenientes da região de São Lourenço do Sul (RS) tem sido utilizada em ensaios de pesquisa em competições de campo desde 1992 pela EMBRAPA Clima Temperado. A produtividade média é de 32t/ha. Esta cultivar salienta-se pela aceitação junto ao consumidor devido ao sabor e a cor da polpa, de um alaranjado intenso. Constitui-se em importante fonte de carotenoides, precursores de vitamina A, componente nutricional essencial para a população, em especial a infantil (CASTRO et al., 2011b).

Doenças virais são consideradas a principal causa de diminuição de produtividade e do declínio de cultivares (MOYER e SALAZAR, 1989) sendo

que se estima que cerca de trinta vírus infectam a cultura da batata-doce (SOUZA et al., 2012). A eliminação desta e outras doenças como salientado no início desta introdução pode e deve ser realizada, principalmente, através do isolamento e cultivo de meristemas (WALKEY, 1978; PIERIK, 1989; BHOJWANI e RAZDAM, 1996).

Portanto, a aplicação da tecnologia da cultura de tecidos pode ajudar a retardar o processo de declínio das cultivares decorrente da acumulação de viroses e mutações nesta espécie. Como consequência, melhorar a produtividade da batata-doce através de mericlones indexados para vírus é importante para aumentar o potencial produtivo de diversos genótipos elite em várias zonas agroecológicas e com boas práticas agrícolas. No entanto, um dos aspectos mais problemáticos para a aplicabilidade da tecnologia da cultura de tecidos em batata-doce é que o procedimento para regeneração de cada genótipo é único devido a enorme variabilidade na resposta a combinação de reguladores de crescimento utilizados nos meios de cultura (TRIQUI et al., 2008) e nas características fisiológicas das plantas (CASSANA et al., 2007).

OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho é apresentar uma alternativa para minimizar os custos de produção e simplificação dos trabalhos de plantas *in vitro*, através da montagem e utilização de biorreatores de imersão temporária e utilização de um novo modelo de válvula duplo solenoide de cinco vias de centro aberto negativo. Além da construção do SIT, foram realizados experimentos preliminares do comportamento de plantas de batata-doce cultivadas nos sistemas de imersão temporária e convencional.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas do Departamento de Botânica do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas.

1.- Material vegetal

Plantas de batata-doce, cvs. BRS-Cuia, BRS-Rubissol e BRS-Amélia, *in vitro*, utilizadas na presente pesquisa, foram gentilmente cedidas pela EMBRAPA Clima Temperado.

2.- Metodologia

a) Estabelecimento *in vitro*

A partir de material vegetal indexado, cultivado em casa de vegetação, as cvs. citadas acima foram estabelecidas *in vitro*, através da cultura de meristemas. Para este procedimento os materiais vegetais foram, inicialmente, desinfestados através do seguinte procedimento: lavagem em água corrente das ramas contendo os meristemas, imersões em álcool 70% por um minuto e solução de hipoclorito de sódio 2% por 20 min e, finalmente três enxágues em água esterilizada.

Os ápices caulinares foram retirados sob estereomicroscópio em câmara de fluxo laminar e inoculados em tubos de ensaio contendo meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), acrescido de 30g.L⁻¹ de sacarose, 100mg.L⁻¹ de mio-inositol, 5mg.L⁻¹ de ácido giberélico (GA₃), 0,05mg.L⁻¹ de ácido indolilacético (AIA) e 0,5mg.L⁻¹ de cinetina (Kin), ágar 6,5g.L⁻¹ e pH ajustado entre 5,6-5,8. O meio de cultura foi esterilizado a 121°C e pressão de 1,5atm, por 20 min. Após a colocação nos meios de cultura, os materiais vegetais foram transferidos para sala de crescimento, inicialmente no escuro por sete dias e depois sob luz fluorescente branca-fria, com densidade de fluxo de fótons de 36μmol.m⁻².s⁻¹, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 24 ±1°C, por 45 dias.

b) Multiplicação do material inicial

As subseqüentes subculturas foram realizadas nas dependências do Laboratório de Cultura de Plantas da UFPel. As brotações primárias,

desenvolvidas diretamente dos meristemas, foram multiplicadas no mesmo meio e condições (densidade de fluxo de fótons e temperatura) citadas acima. Disponibilizou-se cerca de 35mL de meio de cultivo por frasco, esterilizados nas mesmas condições descritas acima. Após autoclavagem, os frascos contendo os meios foram deixados em repouso por três dias, para observação de possível contaminação e após este tempo, os explantes medindo cerca de 10mm de comprimento e contendo entre 2-3 gemas eram acondicionados obliquamente nos referidos meios. Todo este procedimento foi realizado assepticamente em câmara de fluxo laminar. Após a inoculação dos explantes nos frascos, os mesmos eram transferidos para sala de crescimento onde permaneceram cerca de 28 dias até um novo subcultivo.

c) Montagem do Sistema de Imersão Temporária

Utilizou-se uma estante com três prateleiras para a instalação do sistema de imersão temporária. Para a instalação do SIT foram utilizadas válvulas duplo solenoide autocentrante de 5/3 vias, ou seja, com cinco entradas e três possibilidades de combinação, com Centro Aberto Negativo (Parker PVN5-5050-57B), contadores magnéticos, temporizadores, compressor de ar com filtro isento de óleo. As conexões utilizadas foram tubos de poliuretano (PPU) com engate rápido de 10mm de diâmetro, tubos de polipropileno e tubos de silicone de mesmo diâmetro. Em princípio, utilizou-se o tipo de biorreator desenvolvido em conjunto entre o Instituto Nacional de Investigaciones de la Caña de Azúcar, INICA, Cuba, e o Instituto Agronômico de Pernambuco, IPA (utilizado nos laboratórios de cultura de tecidos vegetais e biofábricas de plantas de ambos os institutos), que consiste de dois botijões de água mineral descartáveis, com capacidade para até 5L interligados por mangueiras de silicone, adaptados em tampas previamente manufaturadas. Concomitantemente a este, utilizou-se um biorreator comercial, da empresa RALM, constituído de recipientes de policarbonato (para plantas) e de polipropileno para os meios de cultivo com capacidade para até 2L. Para ambos os biorreatores, a esterilização do ar proveniente do compressor, foi realizada através de filtros PTFE 0,22 μ m e 33mm de diâmetro.

Basicamente e funcionalmente, os biorreatores diferiram quanto à forma de esterilização, já que o conjunto de biorreator formado de botijões descartáveis era esterilizado quimicamente, com lavagem e triplo enxágue em água estéril e imersão em solução de hipoclorito de sódio na concentração de 0,1%, imediatamente antes da utilização. Os biorreatores de policarbonato foram esterilizados via autoclavagem a uma temperatura de 121°C e pressão de 1,5atm por 20 minutos.

Durante o desenvolvimento dos trabalhos de cultivo *in vitro* e devido à quantidade relativamente escassa de explantes das cultivares em estudos, observou-se a necessidade de desenvolver um terceiro biorreator, de menor capacidade, para estudos preliminares ou pilotos. Assim, os frascos e/ou botijões de 5L foram substituídos por frascos de vidros, com capacidade volumétrica de 800mL utilizados primariamente como recipiente para conserva de alimentos. Aos recipientes de vidros adaptaram-se tampas plásticas para fechamento e conexão das mangueiras de silicone de menor diâmetro (6 mm). Os frascos, bem como os meios foram esterilizados via autoclavagem ou por esterilização química, sem a perda de sua função principal.

d) Experimentos com batata-doce

Experimento I - Multiplicação de três cultivares de batata-doce no sistema convencional e SIT

Foram utilizadas três cvs., BRS-Cuia, BRS-Rubissol e BRS-Amélia multiplicadas *in vitro* conforme descrição acima. No sistema convencional foram utilizados cinco (05) explantes em aproximadamente 35mL de meio semissólido, constituído de sais e vitaminas MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) acrescido de 30g.L⁻¹ de sacarose, 100mg.L⁻¹ de mio-inositol, 5mg.L⁻¹ de GA₃ + 0,1 mg.L⁻¹ AIA e o pH corrigido para a faixa de 5,6-5,8, o ágar foi acrescido na proporção de 6,5g.L⁻¹ e seguido de esterilização através de autoclavagem por 20 minutos a uma temperatura de 121°C e pressão de 1,5atm. Os frascos foram mantidos em repouso por 72h a fim de se observar a presença de microrganismos. Em câmaras de fluxo laminar, as plantas foram seccionadas em segmentos de aproximadamente 10mm de comprimento e contendo entre duas e três gemas axilares, os quais foram inoculados no meio

acima citado. Foram utilizados ao todo, quarenta e oito (48) frascos com capacidade de 200mL com cinco (05) explantes cada, por cultivar. As plantas foram mantidas em sala de crescimento por 28 dias. Nas mesmas condições de cultivo enumeradas nos itens anteriores.

No SIT foram inicialmente utilizados botijões descartáveis de água mineral para a inoculação do material vegetal. Esses botijões foram esterilizados conforme descrição acima e antes da inoculação dos explantes foi novamente imerso em uma solução de hipoclorito de sódio a uma concentração de 0,1%, seguida de uma agitação. Após foi escorrido o excesso do desinfestante, mantendo-se uma película da solução dentro dos botijões, garantindo desta forma, completo contato entre a solução esterilizante e os vasilhames. Concomitantemente a esterilização final dos botijões, foi preparado o meio de cultura, com a mesma constituição do meio convencional, com exceção do ágar. O meio de cultura foi esterilizado através de pasteurização a uma temperatura de 100°C (ebulição) por quatro (04) minutos e em seguida deixado em repouso até a temperatura alcançar $\pm 70^{\circ}\text{C}$. Quando os meios alcançavam esta temperatura, os mesmos eram transferidos para os botijões a fim de evitar a deformação dos mesmos pela ação do calor excessivo. Após o envase, os botijões ficavam em repouso por 72h com a finalidade de se observar possível desenvolvimento de microrganismos.

Após, os explantes foram inoculados nos botijões destinados as culturas, utilizando-se vinte (20) explantes, constituídos por estacas com cerca de 10mm de comprimento contendo entre duas e três gemas axilares por botijão, ou seja, quantidade equivalente inoculada nos frascos com meio semissólido. Após a distribuição dos meios (50 mL/explante) e colocação dos explantes nos recipientes, estes foram levados para a câmara de crescimento, para instalação final.

Após estudos prévios, ficaram definidas as frequências de imersão e duração das mesmas: imersão a cada seis (06) horas por dois (02) minutos de passagem de meio, um (01) minuto de repouso e mais três (03) minutos de retorno do meio de cultivo ao respectivo botijão. Após conexão dos biorreatores ao sistema de ar comprimido, os mesmos foram mantidos pelo mesmo tempo e

condições do cultivo convencional. Ao final de 28 dias, os frascos e botijões foram desmontados e as plantas mensuradas quanto ao comprimento, número de gemas, número de brotações aptas à aclimatização, presença de raiz e hiperhidricidade.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 16 repetições para o cultivo semissólido sendo cada repetição constituída de cinco plantas. No cultivo em biorreatores (cultivo líquido) foram utilizadas quatro repetições e cada unidade era constituída de vinte explantes, o equivalente a quatro frascos. A comparação entre as médias dos tratamentos foi realizada pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Experimento II – Comparação entre dois SITs

Neste experimento foi utilizada a cv. BRS Cuia e o procedimento de produção dos explantes utilizados foi o descrito no item anterior. Foram utilizados os SITs constituídos por recipientes de policarbonato (empresa RALM) e garrafas PET descartáveis de água mineral, com capacidade de 5,0L conforme descrição anterior. Foram inoculados 15 explantes nos biorreatores de policarbonato por apresentar uma área menor de exposição, enquanto nos descartáveis foram inoculados 25 explantes devido a sua área de exposição e capacidade de armazenamento de meio de cultivo serem maiores, constituídos por estacas contendo duas a três gemas axilares.

Inicialmente, o meio de multiplicação utilizado, nas primeiras quatro semanas de cultivo, era composto de sais MS + 5mg.L⁻¹ de GA₃ + 0,1 mg.L⁻¹ de AIA + 30g.L⁻¹ de sacarose + 100mg.L⁻¹ de Inositol e o pH corrigido para a faixa de 5,6-5,8. Foram utilizados aproximadamente 50mL de meio por explante nos dois sistemas. Ao final de quatro semanas, o meio inicial, foi substituído pelo de alongamento/enraizamento, composto de sais MS + 100mg.L⁻¹ de Inositol + 5mg.L⁻¹ de GA₃ + 1,0mg.L⁻¹ de AIA e pH corrigido para 5,6-5,8, utilizando-se a mesma relação de 50mL por explante.

O tempo e frequência de imersão, na primeira fase, ou seja, no período de multiplicação foi de 2 minutos a cada 6 horas, passando posteriormente, no período de enraizamento, para seis imersões, com duração de 3 minutos. Após

a preparação dos meios e inoculação dos explantes nos dois sistemas, os frascos foram transferidos para sala de crescimento, com temperatura controlada de $23\pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 16h e densidade de fluxo de fótons de $36\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ proporcionada por lâmpadas fluorescentes brancas-frias.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, sendo utilizado para o cultivo em biorreatores (cultivo líquido), oito repetições (4 descartáveis e 4 policarbonato) e a unidade experimental constituída de 15 e 25 explantes, respectivamente. A comparação entre as médias dos tratamentos foi realizada pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Experimento III – Multiplicação da cv. de batata-doce BRS-Cuia, em sistema de cultivo convencional, em função de diferentes concentrações de sacarose e fonte de luz.

Neste experimento o meio semissólido foi preparado conforme já descrito nos itens anteriores, com exceção dos níveis de sacarose (0; 7,5; 15; e, $30\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) e fontes de luz (fluorescente branca-fria e LED). A densidade de fluxos de fótons e irradiância foi de $36\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, respectivamente para lâmpadas fluorescentes e LED.

Os explantes, cinco por frasco, foram mantidos em câmara de crescimento com temperatura de $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas, por 28 dias. Após este período foram mensurados o comprimento das brotações, número de gemas e brotações aptas à aclimatização.

Foi realizado análise de variância e quando houve diferença significativa as médias foram comparadas pelo teste de Tukey para o fator luminosidade e por regressão para o fator Sacarose.

e) Aclimatização

Após mensuração dos dados das plantas obtidas no experimento I e SIT, foram selecionadas 66 plantas de cada cultivar as quais foram transferidas para bandejas plásticas contendo substrato comercial (CAROLINA) e colocadas em casa de vegetação com temperatura ($25\pm 3^{\circ}\text{C}$) e umidade relativa

controladas. Na primeira semana, adaptou-se uma tampa plástica para que fosse mantida uma câmara úmida evitando desta forma a desidratação das plantas. Das três cultivares semeadas, a cv. BRS-Amélia apresentava sinais de contaminação. Apesar das plantas se apresentarem em estado vegetativo normal, o meio de cultura no ato da mensuração apresentava sinais característicos de contaminação por bactéria, ou seja, odor característico, viscosidade e turbidez. Entretanto, para fins de registro, utilizou-se esta cultivar mesmo sendo esperado um resultado abaixo dos demais. Na primeira semana, as bandejas permaneceram fechadas, determinando 100% de umidade relativa no ambiente interno das mesmas. Após este período, as bandejas foram abertas paulatinamente, possibilitando a diminuição da umidade relativa até 60-70%. Após 21 dias, foram contadas o número de plantas vivas e enraizadas, ou seja, devidamente aclimatizadas.

RESULTADOS

1) Montagem e funcionamento dos biorreatores

A ideia inicial era utilizar uma estante de três níveis de prateleiras com capacidade total para 60 pares de biorreatores, vinte por nível, e transformá-la em uma unidade para o sistema de imersão temporária (SIT). A universidade já dispunha de um compressor de ar, que depois de devidamente revisado, mostrou-se apto à tarefa. Também dispunha de duas válvulas solenoides de via única (Figura 1), além de conexões e tubulação de cobre que se mostraram difíceis de trabalhar devido à falta de ferramentas de serralharia. Estes materiais, atualmente, podem ser substituídos em virtude da disponibilidade, no mercado, de materiais plásticos como poliuretano e polipropileno, além de conexões de engate rápido que são de muito mais fácil manuseio.

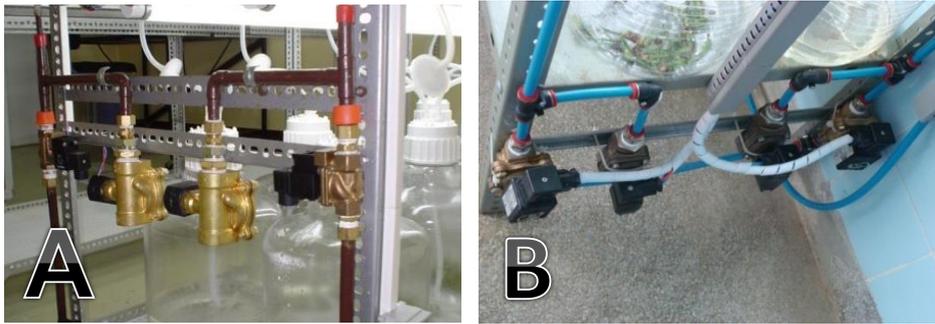


Figura 1 – Apresentação do desenho atual de SIT destacando válvulas solenoides de via única e tubulações de metal (A) e poliuretano (B)

Na instalação do novo biorreator as tubulações foram dispostas de modo a que cada nível, que a princípio comportariam somente 12 pares de biorreatores, passasse a comportar 20 pares do sistema de imersão (constituídos por dois frascos interligados). Além disso, visando diminuir os custos de instalação, adquiriu-se no mercado local, uma válvula duplo solenoide de 5/3 vias (Figura 2) e centro aberto negativo, com a finalidade de dispensar uma segunda válvula para descompressão, conforme se pode observar na Figura 1.

O uso deste tipo de válvula substituiria de uma só vez, quatro válvulas de via única, além de proporcionar economia na aquisição de equipamentos eletrônicos que compõem os comandos elétricos (mais dois contadores e dois temporizadores).

Assim, com todos os materiais e equipamentos adquiridos individualmente montou-se o SIT inicialmente projetado e em sequência fez-se os primeiros testes de funcionamento. Comprovou-se assim que o uso da válvula duplo solenoide funcionava adequadamente, possibilitando a instalação de um SIT mais simples e econômico, além de deixar um visual mais limpo, sem tantas fiações elétricas e tubulações.

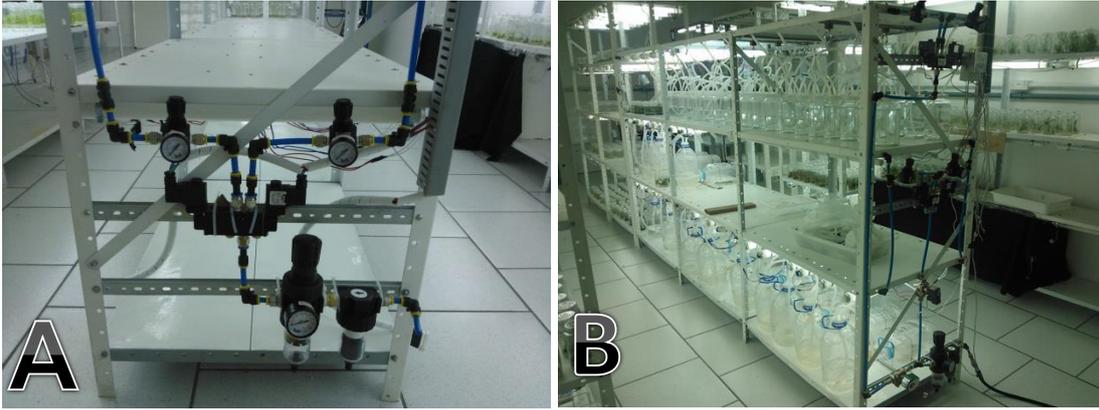


Figura 2. Visualização da estante de SIT na sala de crescimento do Laboratório de Cultura de Plantas/UFPel, destacando a válvula duplo solenoide de 5/3 vias (A) e duas válvulas montadas (B).

Como se sabe, as espécies vegetais possuem características distintas no que diz respeito a tempos e frequências de imersões em SIT. Pensando neste caso, vislumbrou-se a possibilidade de independentizar as prateleiras (níveis) da estante, utilizando mais uma válvula duplo solenoide de 5/3 vias e desta forma tornar possível a utilização do SIT concomitantemente por diversas culturas ou mesmo de uma única cultura, porém com tratamentos com diversos tempos e frequências de imersões. Conseguiu-se esta utilização, aproveitando o compressor e demais componentes do sistema, apenas com a alocação de duas válvulas de via única, já existentes no laboratório. Desta forma logrou-se elaborar uma nova ferramenta que possibilitaria mais diversidade no estudo da cultura de tecidos.

O ambiente interno dos recipientes para cultivo *in vitro* possui uma umidade relativa bastante alta, muitas vezes inviabilizando o desenvolvimento de algumas culturas, principalmente aquelas propensas à hiperhidricidade. No sistema instalado com a válvula duplo solenoide de 5/3 vias, esta anomalia pode ser minimizada através da diminuição da umidade excessiva, simplesmente acionando-se a válvula que comanda o deslocamento de ar para as plantas, sem a necessidade de uma nova imersão de meio de cultivo.

Como o foco principal do desenvolvimento do SIT é sua utilização em biofábricas ou outros empreendimentos comerciais, um dos aspectos mais importantes é a diminuição dos custos, como salientado acima, e a utilização

de recipientes de grande volume, como os garrafões descartáveis de água mineral com capacidade para 5L, é um destes pré-requisitos. No entanto, visando comparar os resultados obtidos com o sistema montado acima, também foram utilizados conjuntos de biorreatores comerciais com recipientes de policarbonato, fabricados pela Empresa RALM de São Paulo (Figura 3).



Figura 3. Visualização dos SIT de garrafões PET (A) e de policarbonato da empresa RALM (B)

Entretanto, em laboratórios de pesquisa, devido ao manuseio de grande variedade de culturas e pequena quantidade de material disponível, observou-se a necessidade do desenvolvimento de um biorreator com recipientes de menor capacidade, porém que não perdesse seu objetivo principal que seria a observação e multiplicação deste material vegetal e seus subprodutos. Em nova pesquisa de mercado, encontrou-se um recipiente de vidro, com capacidade total para 800mL utilizado originalmente para conserva de alimentos, ao qual adaptou-se uma tampa com as devidas tubulações, o qual foi transformado em um microbiorreator (Figura 4). Após a montagem dos biorreatores descritos acima, foram, inicialmente, realizados testes de funcionamento, com algumas espécies disponíveis no laboratório, como amora-preta, framboesa e macieira, utilizando tempos e frequências de imersões similares citadas na literatura (WATT, 2012; ARAGON et al., 2014)

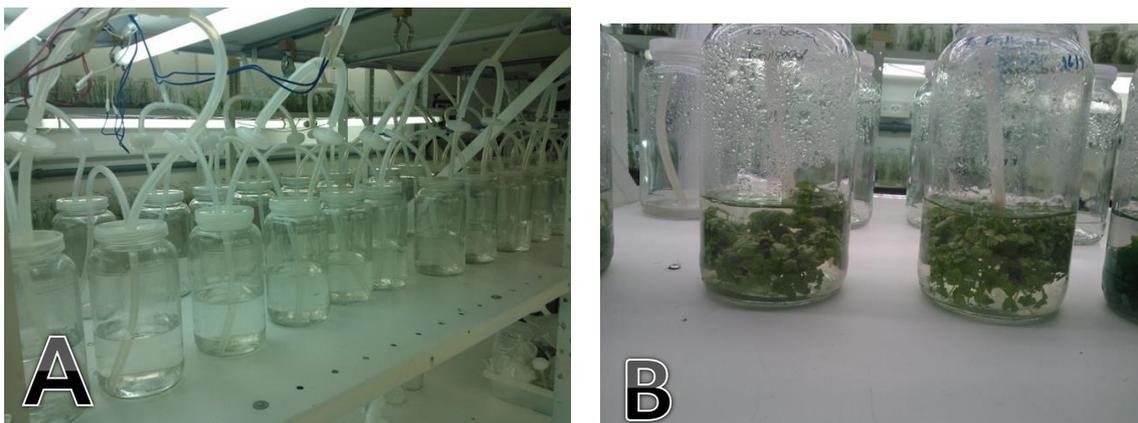


Figura 4. Visualização de microbiorreatores em teste (A) e com cultivo piloto de amora-preta (B)

Os testes realizados com plantas de pequenas frutas e macieira, mostraram resultados altamente promissores, alcançando taxas de multiplicação de 21,6/1 e 12,6/1 em amora-preta e framboesa, respectivamente, resultados superiores aos obtidos no sistema convencional, principalmente em amora-preta (4/1) (SILVA, 2013). Enquanto que em amora-preta verificou-se hiperidricidade, o mesmo não ocorreu em framboesa, bem como em ambas as culturas não se verificou a presença de raízes. Já, os dados obtidos para macieira foram inferiores aos das espécies citadas acima, mas superiores aos alcançados no sistema convencional (relação 2/1).

2) Experimentos com batata-doce

2.1 Multiplicação de três cultivares de batata-doce no sistema convencional e SIT

A análise estatística dos resultados mostrou que houve interação entre as cultivares e os sistemas de multiplicação utilizados nas variáveis comprimento e número de gemas, enquanto que para número de brotações houve apenas uma interação simples entre as cultivares a 5% de probabilidade de erro pelo teste de Tukey. Por outro lado, não houve diferenças quanto ao enraizamento das plantas, pois todas as plantas apresentaram raízes (100%) e não foi observada a presença de anomalias morfológicas, especialmente hiperidricidade.

As plantas desenvolvidas no sistema convencional (SC) foram significativamente maiores que as brotações no sistema de imersão temporária (SIT), independente da cultivar estudada (Tabela 1). As diferenças pró SC alcançaram valores tão altos quanto 478,9, 372,6 e 268,2% para as cvs. BRS-Cuia, BRS-Rubissol e BRS-Amélia, respectivamente.

Tabela 1- Comprimento médio de brotações, número de gemas axilares e número de brotações por planta aclimatizável de batata-doce desenvolvidas em sistema convencional (SC) e sistema de imersão temporária (SIT) por 28 dias.

Cultivar	Comprimento (mm)		Número de gemas		Número de brotações	
	SC	SIT	SC	SIT	SC	SIT
BRS – CUIA	77,0 Aa	13,3 Ba	5,9 Ab	6,0 Aa	1,0 b	1,7 a
BRS- RUBISSOL	55,3 Ab	11,7 Ba	7,5 Aa	6,0 Ba	2,0 a	2,0 a
BRS- AMELIA	54,5 Ab	14,8 Ba	3,1 Ac	4,0 Ab	1,5 ab	1,5 a
CV (%)	18,24		14,68		27,35	

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula para tratamento e minúscula para cultivares não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Quanto ao número de gemas, somente a cv. BRS-Rubissol destacou-se apresentando diferença das demais cultivares (média 7,5 gemas por planta), ou seja, 27,1 e 141,9% superior, respectivamente, as cvs. BRS-Cuia e BRS-Amélia. Em relação aos sistemas de cultivo, esta cultivar apresentou melhor resposta no sistema convencional (Tabela 1), revelando, possivelmente, uma aptidão desta cultivar para a micropropagação convencional.

A cv. BRS-Cuia apresentou um desempenho mediano quanto aos sistemas de cultura. Por fim, a cv. BRS-Amélia, não apresentou bons

resultados quando comparado às duas cultivares anteriores em ambos os sistemas de micropropagação.

Em relação ao número de brotações, observou-se que as três cultivares responderam igualmente, independente do sistema de cultura empregado (Tabela 1). Por outro lado, dentre as cvs., a BRS-Rubissol foi superior as demais quando cultivada no sistema convencional.

2.2) Comparação entre dois sistemas de imersão temporária: descartável e pré-fabricado.

Neste experimento, buscou-se verificar se haveria diferenças de produtividade entre dois sistemas de imersão temporária de distintas construções. A análise estatística dos resultados deste experimento demonstrou que não ocorreu diferenças entre os tipos de biorreatores pelo teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade, ou seja, independente se foi utilizado o biorreator com garrafas PETs ou com recipientes de policarbonato da Empresa RALM. No entanto, os sistemas com garrafas PET apresentaram resultados ligeiramente maiores que o sistema RALM em todas as variáveis (Tabela 2), ou seja, 16,8, 30,9 e 3,3% respectivamente, quanto ao comprimento da parte aérea das plantas, número de gemas e brotações, indicando que o sistema com garrafas PET, além de serem mais barato, apresenta resultados positivos.

Tabela 2 - Médias de comprimento do broto, número de gemas e número de brotos de plantas de batata-doce cv. BRS-Cuia cultivadas em SIT montados com garrafas PET e policarbonato. Pelotas, RS, 2014.

Tipo de biorreator	Média do comprimento do broto (mm)	Média do nº de gemas	Média do número de brotos
Descartável	35,16 A	6,95 A	1,24 A
Policarbonato	30,09 A	5,31 A	1,20 A

2.3) Multiplicação da cv. de batata-doce BRS-Cuia no sistema de cultivo convencional, em função de diferentes concentrações de sacarose e fonte de luz.

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro, ou analisadas por regressão polinomial, utilizando o software WINSTAT 1.0 (MACHADO e CONCEIÇÃO, 2003).

Para a variável comprimento, houve significância estatística apenas para o fator concentração de sacarose. Assim, como concentração de sacarose é um fator quantitativo optou-se pela regressão polinomial. Entretanto, não houve interação entre os fatores, tampouco significativo para luminosidade. Assim, optou-se pela construção do gráfico abaixo (Figura 5), que mostra a linha de tendência com aumento considerável no comprimento das plantas concomitante à concentração de sacarose até o nível de $7,5\text{g.L}^{-1}$. A partir desta concentração, os comprimentos se mantiveram praticamente constante até a concentração de $30,0\text{ g.L}^{-1}$.

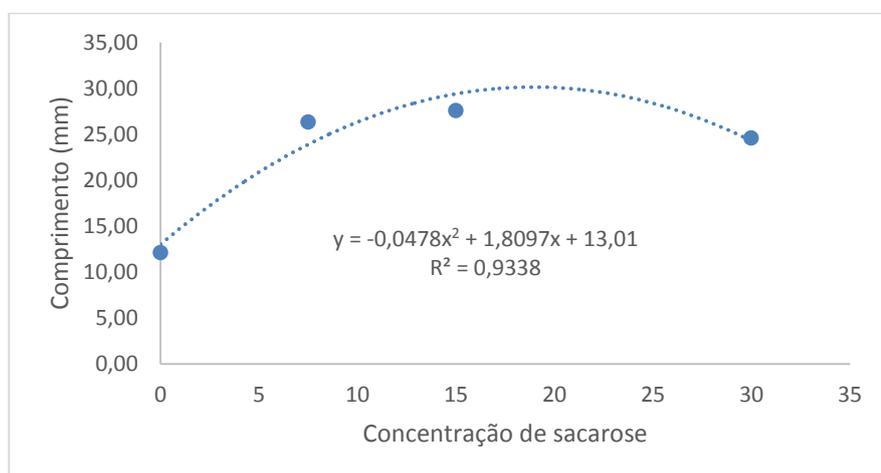


Figura 5. Comprimento de plantas de batata-doce, cv. BRS-Cuia, desenvolvidas em meio de cultura MS com diferentes concentrações de sacarose no sistema convencional. Pelotas, RS, 2014.

Para a variável número de gemas, houve interação entre os fatores concentração de sacarose e fontes de luz representado no gráfico e tabela abaixo (Figura 6). Pode-se observar que, com iluminação LED ocorreu um aumento do número de gemas até a concentração de 15g.L⁻¹ de sacarose diminuindo na concentração mais elevada (30g.L⁻¹). Já, nas plantas desenvolvidas sob luz fluorescentes, esta variável praticamente manteve-se constante independente da concentração do açúcar. Embora as tendências observadas, as lâmpadas LED somente foram superiores às lâmpadas fluorescentes na concentração de 15g.L⁻¹ (5,8 e 4,92, respectivamente).

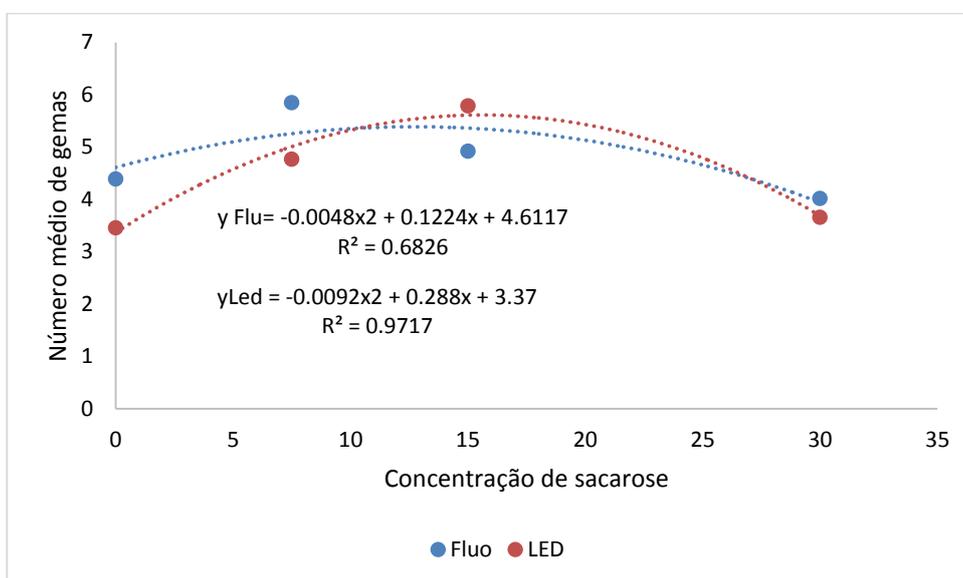


Figura 6. Número de gemas de plantas de batata-doce, cv. BRS-Cuia, cultivadas em meio MS com diferentes concentrações de sacarose e fontes de luz, em sistema convencional. Pelotas, 2014.

2.4) Aclimatização

Após 21 dias da transferência das plantas desenvolvidas e enraizadas no SIT (experimento I), para substrato sólido em casa de vegetação, observou-se alto índice de aclimatização das mesmas nas cvs. BRS-Cuia (95,5%) e BRS-Rubissol (89,4%) (Tabela 3 e figura 7). O mesmo não ocorreu com a cv. BRS-Amélia, na qual somente 37,9% das plantas inicialmente transferidas

sobreviveram. Este resultado pode ter sido decorrente da contaminação do meio de cultivo ao final do período de enraizamento nesta cultivar.

Tabela 3 - Percentagem de aclimatização de três cvs. de plantas de batata-doce, desenvolvidas em SIT e transferidas para casa de vegetação durante 21 dias. Pelotas, RS, 2014

CULTIVAR	Nº de plantas semeadas	Nº de plantas aptas	% de pegamento
BRS-Cuia	66	63	95,5
BRS-Rubissol	66	59	89,4
BRS-Amélia	66	25	37,9



Figura 7. Visualização de plantas de batata-doce postas à aclimatização em seguida à coleta (A) e após 21 dias de aclimatização (B).

DISCUSSÃO

Os resultados obtidos em relação aos primeiros testes de multiplicação de batata-doce mostrou que o sistema artesanal de imersão temporária (SIT) montado no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas do Departamento de

Botânica da UFPel, com o modelo de válvulas duplo solenoide de 5/3 vias se mostrou eficiente quanto aos objetivos propostos, ou seja, apresentando resultados semelhantes aos do sistema comercial da Empresa RALM (Tabela 2). O uso deste tipo de válvula é pioneiro nos equipamentos similares utilizados nos laboratórios e biofábricas (LORENZO et al., 1998; GEORGIEV et al., 2014).

O uso deste tipo de válvula duplo solenoide em substituição as válvulas de via única, possibilita, além da diminuição dos custos de instalação de um biorreator, melhor manuseio do sistema como um todo, pois esta válvula duplo solenoide substitui quatro válvulas de via única, bem como todos os outros equipamentos necessários para o funcionamento de cada válvula de via única (contatores, temporizadores, fios, adaptadores de engate rápido e tubulações, tanto de poliuretano e polipropileno). O sistema estabelecido permite, ainda, melhor monitoramento dos vasos de cultivo, quanto à umidade relativa no interior dos mesmos, proporcionando melhores condições de trocas gasosas e conseqüentemente diminuição de anomalias fisiológicas e/ou estruturais das em desenvolvimento (ROELS et al., 2005), bem como facilita as programações quanto as frequências e tempos de imersão (GEORGIEV et al., 2014)

Outra possibilidade que se vislumbra com a utilização deste equipamento é que o mesmo poderá servir de base para os futuros alunos, que ingressarem neste campo da pesquisa, podendo aproveitar o sistema de válvulas e tubulações existentes para utilizá-lo com a adição de CO₂, diretamente no recipiente de cultivo, e estudar o comportamento das plantas em ambiente autotrófico, bem como a adição de quaisquer outros gases e seu comportamento sobre as plantas mantidas *in vitro* (XIAO et al., 2011).

Em relação aos testes iniciais com a cultura de batata-doce, os resultados obtidos no SIT não foram significativos quanto as variáveis analisadas, ou seja, comprimento e número de gemas e brotações (Tabela 1). Tais resultados podem ser atribuídos a diferentes fatores, como: tempos e frequências de imersão dos explantes; composição dos meios de cultura, número de explantes por volume de meio disponível e respostas genotípicas.

Quanto aos primeiros fatores, foram inicialmente estabelecidas seis e quatro imersões no período de 24 horas de dois e três minutos em cada imersão, conforme utilizadas em trabalhos anteriores com outras espécies (PEREZ-ALONSO et al., 2007; ARENCIBIA et al., 2013). Possivelmente estes tempos e frequências de imersões não tenham sido adequados a batata-doce, visto que os tempos acima especificados foram usados para batata e cana-de-açúcar. Segundo Watt (2012) as respostas no SIT são variáveis em função da espécie, sendo tempo e número de imersões altamente significativos em abacaxi e jacarandá, com ganhos de 533% (3 min/12 vezes) e 585% (15 min/4 vezes), respectivamente, em relação ao sistema convencional. Por outro lado, com a cultura do Inhame as respostas foram pouco expressivas, ou seja, apenas 12% (15 min /6 vezes).

Os meios de cultura utilizados neste trabalho foram os mesmos para os dois sistemas de cultivo (convencional e SIT). O referido meio foi utilizado para a cultura da batata-doce no sistema convencional (DODDS et al., 1992) e, talvez sua composição não seja a mais adequada para o cultivo destas cultivares no SIT, pois segundo Zhu et al. (2005) a sensibilidade das células e tecidos podem variar consideravelmente, principalmente quanto a reguladores de crescimento, entre este e o sistema convencional. Tais afirmativas também foram realizadas para a composição mineral e concentração de açúcares, em estudos realizados por Posada (2002), com macieira. O referido autor verificou que a multiplicação de estacas de porta-enxerto M9 era mais efetiva no SIT quando o meio empregado no sistema convencional era alterado, com aumento na concentração de sacarose (30 para 40g.L⁻¹) e redução da quantidade de nitrogênio em 25% em relação ao total. Neste mesmo sentido, Junkes (2015) verificou alterações significativas no número médio de brotações em macieira (117%) no SIT, com diferente composição mineral do meio MS, em relação ao sistema convencional.

Convém salientar, que embora os primeiros testes não tenham apresentado resultados expressivos quanto as variáveis analisadas, não foram observadas nas plantas cultivadas nos dois sistemas, qualquer anomalia, como exemplo a indução de hiperidricidade, muito comum em determinadas espécies, principalmente quando desenvolvidas em meios líquidos (WANG et

al. 2013). Esta resposta pode estar relacionada à composição do meio de cultura empregado como salientado acima, tanto no sistema convencional, como no SIT. Na batata-doce, como a sua multiplicação ocorre através do desenvolvimento de meristemas axilares, a composição hormonal dos meios apresentam baixa concentração ou ausência completa de citocininas, as quais são fatores desencadeadores da hiperidricidade, além de indução de calos na base dos explantes (HAZARIKA, 2006). Já, o meio utilizado neste trabalho, apresentava baixa concentração de citocinina ($0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de cinetina) e auxina ($0,05 \text{ mg.L}^{-1}$ de ácido indolilacético) e alta concentração de ácido giberélico ($5,0 \text{ mg L}^{-1}$), resultando em crescimento das brotações somente por gemas axilares e formação de raízes funcionais.

Considerando que o SIT instalado no laboratório possibilita a inclusão de CO_2 no interior dos frascos de cultura e estabelece um desenvolvimento autotrófico, foi realizado um experimento, no sistema convencional, para verificar o comportamento de explantes de batata-doce em função da concentração de sacarose e tipo de luz durante o seu desenvolvimento (Figuras 1 e 2 e tabela 2). Pode-se observar que houve crescimento das plantas e aumento do número de gemas quando as culturas foram submetidas tanto as lâmpadas LED, como fluorescentes, com densidade de fluxo de fótons de $36 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Tal resultado salienta que esta espécie, não é especialmente exigente quanto ao tipo de luz incidente. Por outro lado, embora tenha ocorrido pequeno desenvolvimento sem sacarose, este foi significativamente incrementado com a adição de 15 g.L^{-1} deste açúcar, ou seja, bem abaixo da concentração de sacarose utilizada para a maioria das espécies vegetais (RADMAN et al., 2001; ZANANDREA et al., 2006; BANDEIRA et al., 2013). Estes resultados demonstram que a batata-doce, talvez seja um material vegetal propício para o estabelecimento de um crescimento fotoautotrófico (XIAO et al., 2011)

As plantas desenvolvidas e enraizadas no SIT (Tabela 4) apresentaram altas percentagens de aclimatização, principalmente em duas das cultivares desenvolvidas (BRS-Cuia e BRS-Rubissol) com percentuais de 95,5 e 89,4%. Já na cv. Amélia este percentual baixou para 37,9%. Tal resposta, na cv. BRS-Amélia pode ser atribuída aos sinais de contaminação observada no fim do

período de enraizamento *in vitro*, visto que o meio de cultivo apresentava turbidez, viscosidade e odor característico de contaminação bacteriana. A alta percentagem de aclimatização obtida esta de acordo com resultados prévios com outras espécies, visto que como salientado por Aragon et al., (2010), plantas oriundas do SIT apresentam melhor resposta ao estresse antioxidativo, causada pela transferência da condição *in vitro* para *ex vitro*.

Finalmente, embora os resultados iniciais com batata-doce não tenham sido expressivos quanto as variáveis estudadas, necessitando de ajustes no protocolo de micropropagação, o biorreator instalado no Laboratório de Cultura de Tecidos da UFPel, além de apresentar funcionamento similar ao biorreator comercial, apresenta custo de aquisição 86% inferior ao fabricado pela empresa RALM. Pois, enquanto um par de biorreator da empresa RALM custa R\$ 944,00 instalado, o modelo montado na universidade foi orçado em R\$ 132,00.

CONCLUSÕES

- O sistema SIT instalado no laboratório de cultura de tecidos da UFPel apresenta bom funcionamento, similar aos manufaturados, com a vantagem de ter custo de instalação substancialmente inferior aos produzidos comercialmente;

- Experimentos preliminares com a batata-doce e outras espécies demonstram que os microbiorreatores desempenham funções semelhantes aos biorreatores tradicionais podendo, portanto, serem utilizados em pesquisas onde se dispõe de pouco material vegetal;

- Nas condições em que foram realizados os experimentos, as plantas de batata-doce desenvolvidas no SIT apresentam um desenvolvimento normal, com raízes bem desenvolvidas e sem anomalias (presença de hiperidricidade), aptas à aclimatização;

- Mesmo que os resultados da micropropagação das plantas no SIT não tenham tido uma resposta muito positiva em relação ao método convencional,

quanto as variáveis estudadas, mostram que em função da sua operacionalidade e custos de produção, este sistema, com pequenos ajustes poderá ser utilizado comercialmente para a espécie em questão.

REFERÊNCIAS

ALAM, I., SHARMIN, S. A., NAHER, M. K., ALAM, M., ANISUZZAMA, M., e ALAM, M. F. (2013). Elimination and detection of viruses in meristem-derived plantlets of sweet potato as a low-cost option toward commercialization. *Biotech*, 3:153-164.

ARAGON, C. E., SANCHEZ, C., GONZALEZ-OLMEDO, J., ESCALONA, M., CARVALHO, L., e AMÂNCIO, S. (2014). Comparison of plantain plantlets propagated in temporary immersion bioreactors and gelled medium during in vitro growth and acclimatization. *Biologia Plantarum*, 1:29-38.

ARENCIBIA, A. D., VERGARA, C., QUIROZ, K., CARRASCO, B., e GARCIA-GONZALES, R. (2013). Establishment of photomixotrophic cultures for raspberry micropropagation in Temporary Immersion Bioreactors (TIBs). *Scientia Horticulturae*, 49-53.

ASGHARI, S., ABBAS, S. J., CHEN, L., HE, X., & QIN, Y. (2013). Micropropagation of *Myrica rubra* Sieb. and Zucc. using shoot tips and nodal explant. *African Journal of Agricultural Research*, 8(17):1731-1737.

BANDEIRA, J. M., SILVA, C. P., THUROW, L. B., BRAGA, E. J., PETERS, J. A., e BIANCHI, V. J. (2013). In vitro establishment and multiplication of Japanese plum cv. América. *Revista de la Facultad de Agronomía La Plata*, 112 (1): 44-50.

BHATTI, S., e JHA, G. (2010). Current trends and future prospects of biotechnological interventions through tissue culture in apple. *Plant Cell*, 29:1215-1225.

BHOJWANI, S. S., e RAZDAN, M. K. (1996). *Plant Tissue Culture: Theory and practice*. Amsterdam: Elsevier.

BIENIEK, M. E., HARRELL, R. C., e CANTLIFFE, D. J. (1995). Enhancement os somatic embryogenesis of *Ipomoea batatas* in solid cultures and production of mature somatic embryos in liquid cultures for application to a bioreactor production system. *Plant Cell Tissue Organ Culture*.

CARVALHO, A. C., TORRES, A. C., BRAGA., E. J. B., LEMOS, E. E., SOUZA, F. V., WILLADINO, L., CÂMARA, T. R. (2011). Glossário de Cultura de Tecidos de Plantas. *Plant Cell Culture and Micropropagation*, v. 7. n.1, 30-60.

- CASSANA, F. F. (2007). *Caracterização fotossintética e do desenvolvimento de plantas de batata-doce cultivadas in vitro e aclimatizadas*. Pelotas: Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) Universidade Federal de Pelotas.
- CASTRO, L. A., e BECKER, A. (2011a). *Batata-doce BRS- Rubissol*. Capão do Leão: EMBRAPA.
- CASTRO, L. S., e BECKER, A. (2011b). *Batata-doce BRS-Amélia*. Capão do Leão: EMBRAPA.
- CASTRO, L. A., OLIVEIRA, A. C., EMYGDIO, B. M., e BECKER, A. (2012). *Padronização de procedimentos para obtenção de etanol de batata-doce na Embrapa Clima Temperado*. Pelotas, RS.
- CASTRO, L. A., TREPTOW, R., e BECKER, A. (2012). *Potencialidade da cultivar de batata-doce BRS-Cuía como matéria prima para a produção de etanol*. Pelotas, RS.
- CHAKRABARTY, D., PARK, S. Y., ALI, M. B., SHIN, K. S., e PAEK, K. Y. (2005). Hyperhydricity in apple: ultrastructural and physiological aspects. *Tree Physiology*, 26: 377-388.
- CHU, I. (1995). "Economic analysis of automated micropropagation. In: A.-C. J., K. T., e M. SMITH, *Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture* (pp. 19-27). Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- COUTO, M. (2003). *Propagação in vitro dos portaenxertos híbridos de pessegueiro "Barrier" e "Cadman" (Prunus sp.)*. Pelotas: Dissertação (Mestrado em Agronomia - Fruticultura de Clima Temperado) - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.
- DEA, I. C. (1989). Industrial Polysaccharides. *Pure & Applied Chem.*, 61:1315-1322.
- DOBRÁNSKI, J., e SILVA, J. A. (2010). Micropropagation of apple - A review. *Biotechnology Advances*, 28:452-488.
- DODDS, J. H., ESPINOZA, N., LIZARRAGA, R., PANTA, A. (1992), *Tissue culture of Ipomoea batatas: micropropagation and maintance*. 21p. CIP.
- DUCOS, J. P., TERRIER, B., COURTOIS, D., e PÉTIARD, V. (2008). Improvement of plastic-based disposable bioreactors for plant science needs. *The Phytochemical Society of Europe*, 7: 607-613.
- ERIG, A. C., SCHUCH, M. A., e SILVA, L. C. (2004). Multiplicação in vitro de macieira (*Malus domestica* BORKH.) cv. Galaxy: Meio de cultura e agentes solidificantes alternativos. *Revista Brasileira de Agrociências*, v. 10 (3) p. 297-302.

ESCALONA, M., LORENZO, J. C., GONZALES, B., DANQUITA, M., GONZÁLES, J. L., DESJARDINS, Y., e BORROTO, C. G. (1999). Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems. *Plant Cell Reports*, 18: 743-748.

ETIENNE, H., e BERTHOULY, M. (2002). Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69:215-231.

FAOSTAT, F. A. (25 de SETEMBRO de 2014). <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>. Acesso em 20 de JANEIRO de 2015, disponível em FAOSTAT.

FEHE'R-JUHA'SZ, E., MAJER, P., SASS, L., LANTOS, C., CSISZA'R, J., TURO'CZY, Z., MIHA'LY, R.; A., MAI; HOVA'TH, G. V.; VASS, I.; DUDITS, D.; e PAUK, J. (2014). Phenotyping shows improved physiological traits and seed of transgenic wheat plants expressing the alfafa aldose reductase under permanent drought stress. *Acta Physiol Plant*, 36:663-673.

FEI, L., e WEATHERS, P. J. (2014). From cells to embryos to rooted plantlets in a mist bioreactor. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 116:37-46.

GAMBORG, O. L., e SHYLUK, J. P. (1970). The culture of plant cells with ammonium salts as sole nitrogen source. *Plant Physiology*, 45:598-600.

GAMBORG, O. L., CONSTABEL, F., e SHYLUK, J. P. (1974). Organogenesis in callus from shoot apices *Pisum sativum*. *Physiology Plant*, 30: 125-128.

GAMBORG, O. L., MURASHIGE, T., THORPE, A., e VASIL, K. (1976). Plant Tissue Culture Media. *In Vitro*.

GEORGE, E. F., e DEBERGH, P. C. (2008). *Micropropagation: uses and methods*. Dordrecht, Netherlands: Springer.

GEORGE, E. F., e HALL, M. A.-J. (2008). In: *Plant Propagation by Tissue Culture 3rd edition*. Springer.

GEORGIEV, V., SCHUMANN, A., PAVLOV, A., e BLEY, T. (2014). Temporary immersion systems in plant biotechnology. *Engineering in Life Science*, 14: 607-621.

GERALD, L. T. (2011, 1ª ed. 490p.). *Biofábrica de Plantas - Produção industrial de plantas in vitro*. São Carlos, SP: Antiqua.

GOMES, N. D. (2013). *Radiação gama e conservação in vitro de Amoreira-preta*. Universidade Federal de Pelotas: Dissertação (Mestrado) Programa de Pós Graduação em Fisiologia Vegetal.

GROSSER, J. W., e GMITTER JR., F. G. (2011). Protoplast fusion for production of tetraploids and triploids: applications for scion and rootstock breeding in citrus. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 104: 343-357.

HAZARIKA, B. N. (2006). Morpho-physiological disorders in in vitro culture of plants. *Scientia horticultrae*, 108:105-120.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATISTICA IBGE. (20 de setembro de 2013). Acesso em 20 de janeiro de 2015, disponível em <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/tabela1pam.shtm>.

IMMONEN, S., e ANTTILA, H. (2000). Media composition and anther planting for production of androgenic green plants from cultivated rye (*Secale cereale* L.). *Journal of Plant Physiology*, 156: 204-210.

JIMENEZ, E., PEREZ, N., FERIA, M., BARBON, R., CAPOTE, A., CHAVEZ, M., QUIALA, E.; e PEREZ, J. C. (2000). Improved production of potato microtubers using a temporary immersion system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 59:19-23.

JUNKES, C. F. (2015). *Estudos preliminares para micropropagação de Malus prunifolia, cv. Marubakaido em sistema de imersão temporária*. Pelotas, RS: Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) Universidade Federal de Pelotas.

KOZAI, T., XIAO, Y., NGUYEN, Q. T., AFREEN, F., e ZOBAYED, S. M. (2005). PHOTOAUTOTROPHIC (SUGAR MEDIUM FREE) MICROPROPAGATION SYSTEM FOR LARGE-SCALE COMMERCIALIZATION. *Propagation of Ornamental Plants*, 23-34.

LLOYD, G., e McCOWN, B. (1980). Commercially feasible micropropagation of mountain laurel *Kalmia latifolia* by use of shoot tip culture. *Proc. Int. Conf. Plant Prop. Soc.*, 421-427.

LORENZO, J. C., GONZALES, B., ESCALONA, M., TEISSON, C., ESPINOSA, P., e BORROTO, C. (1998). Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 54: 197-200.

MACHADO, A. A., e CONCEIÇÃO, A. R. (2003). *Sistema de análise estatística pa Windows. Winstat versão 1.0*. UFPel.

MISHRA, J., BHANDARI, H., SINGH, M., RAWAT, S., AGNIHOTRI, R. K., MISHRA, S., e PUROHIT, S. (2011). Hairy root culture of *Picrorhiza kurroa* Roylex ex Benth.: a promising approach for the production of picrotin and picrotoxinin. *Acta Physiol Plant*, 33: 1841-1846.

MOYER, J. W., e SALAZAR, L. F. (1989). Virus and viruslike diseases. *Plant Diseases*, 451-455.

MUNIZ, A. W., SÁ, E. L., DALAGNOL, G. L., e AMÉRICO FILHO, J. (2013). Rooting and acclimatization of micropropagated marubakaido apple rootstock using *Adesmia latifolia* rhizobia. *Springer Plus*, 2:437-441.

MURASHIGE, T. (1974). Plant Propagation Through Tissue Cultures. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 25: 135-66.

MURASHIGE, T., e SKOOG, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Acta Physiologiae Plantarum*, 15:473-497.

PAEK, K. Y., HAHN, E. J., e SON, S. H. (2001). Application of bioreactors for large-scale micropropagation systems of plants. *In vitro cell. Dev. Biol.*, 37: 149-157.

PASQUALETTO, P. L., ZIMMERMAN, R. H., e FORDHAM, I. (1986). Gelling agent and growth regulator effects on shoot vitrification of 'Gala' apple in vitro. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 111:976-980.

PEREIRA-NETO, A., PETKOWICZ, C. L., CRUZ-SILVA, C. T., GAZZONI, M. T., MELLO, A. F., e SILVEIRA, J. L. (2007). Differential performance of marubakaido apple rootstock shoots grown in culture media containing different agar brands: dynamic rheological analysis. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant.*, 43:356-363.

PEREZ-ALONSO, N., JIMENES, E., FERIA, M., CAPOTE, A., BARBON, R., QUIALA, E., e CHAVEZ, M. (2007). Effect of inoculum density and immersion time on the production. *Biotechnología Vegetal Vol. 7*, 3: 149 - 154.

PIERIK, R. L. (1989). *In vitro culture of higher plant*. Bostan, Lancaster, Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers.

POWELL, W., e UHRIG, H. (1987). Anther culture os solanum genotypes. *Plant Cell Tissue Organs Cult*, 11:13-24.

QUIALA, E., CANAL, M. J., MEIJON, M., RODRIGUEZ, R., CHAVEZ, M., VALLEDOR, L., FERIA, M.; e BARBON, R. (2012). Morphological and physiological responses of proliferating shoots of teak to temporary immersion and BA treatments. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 109:223–234.

RADMANN, E. B., FACHINELLO, J. C., e PETERS, J. A. (2002). Efeitos de auxinas e condições de cultivo no enraizamento in vitro de porta-enxertos de macieira "M-9". *Revista Brasileira de Fruticultura*, 24(3) 624-628.

REY, M. S., BENEMAN, D. P., PINTO, L. S., SILVA, F. S., BRAGA, E. J. B., MOURA, A. B., PIEROBOM, C. R.; e PETERS, J. A. (2012). Indução de resistência em arros contra *Bipolaris oryzae* Breda de Hann, através da

expressão constitutiva de um gene de quitinase. *Bioscience Journal Uberlândia*, 28-5- p.745-752.

ROELS, S., ESCALONA, M., CEJAS, I., NOCEDAS, C., RODRIGUEZ, R., CANAL, M. J., SANDOVAL, J.; e DEBERGH, P. (2005). Optimization of plantain (Musa AAB) micropropagation by temporary immersion system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 82:57-66.

SANTA-MARIA, M., PECOTA, K. V., YENCHO, C. G., ALLEN, G., e SOSINSKI, B. (2009). Rapid shoot in industrial "high starch" sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.) genotypes. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 97:109-117.

SASTRY, K. S., e ZITTER, T. A. (2014). Management of Virus and Viroids Diseases of Crops in The Tropics. In: K. S. Sastry, *Plant Virus and Viroids Diseases in the Tropics* (pp. 149-480). Springer Netherlands.

SCHENK, R. V., e HILDEBRANDT, A. C. (1972). Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant culture. *Can J Bot*, 50:199-204.

SCHERER, R. F., FRAGA, H. P., DAL VESCO, L. L., STINMACHER, D. A., e GUERRA, M. P. (2013). Nodule cluster cultures and temporary immersion bioreactors as a high performance micropropagation strategy in pineapple (*Ananas comosus* var. *comosus*). *Scientia Horticulturae*, 151:38-45.

SILVA, J. B., e MAGALHAES, J. S. (2004). *Cultura da Batata-doce*. Brasília: Embrapa.

SILVA, N. D. (2013). *Radiação gama e conservação in vitro de amoreira preta*. Universidade Federal de Pelotas: Dissertação (Mestrado) Programa de Pós Graduação em Fisiologia Vegetal.

SOUZA, J. M., ALVES, R. C., e FERNANDES, F. R. (2012). *Levantamento da diversidade de virus em batata-doce no Brasil*. Brasília.

TAKAYAMA, S., e MISAWA, M. (1981). Mass Propagation of Begonia X hiemalis plantlets by shake culture. *Plant Cell Physiology*, 122: 461-467.

TEISSON, C., e ALVARD, D. (1999). In vitro production of potato microtubers in liquid medium using temporary immersion. *Potato Research*, 42:499-504.

TEIXEIRA DA SILVA, J., DOBRANSKI, J., e ROSS, S. (2013). Phloroglucinol in plant tissue culture. *In Vitro Cell.Dev.Biol*, 49:1–16.

TEIXEIRA, J. B., e CID, L. P. (2010). Biorreatores para a produção de mudas em larga escala. In: L. P. Cid, *Cultivo in vitro de plantas* (p. 303). Brasília: Embrapa.

- TORRES, A. C., BARBOSA, N. V., WILLADINO, L., GUERRA, M. P., FERREIRA, C. F., e PAIVA, S. A. (2001). *Meio e condições de incubação para cultura de tecido de plantas*. Brasília: EMBRAPA - Circular Técnica 24.
- TRIQUI, Z. E., GUERIDA, A., CHLYAH, A., CHLYAH, H., SOUVANNAVONG, V., HAICOUR, e R., SIHACHACK, D.. (2008). Effect of genotype, gelling agent, and auxin on the induction of somatic embryogenesis in sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam.). *Comptes Rendus Biologies*, 198-205.
- WALKEY, D. G. (1978). In Vitro methods for virus elimination. In: T. A. Thorpe, *Frontiers of plant tissue culture* (pp. 245-254). Alberta, Canadá: Calgary Press.
- WANG, Q.-M., e WANG, L. (2012). An evolutionary view of plant tissue culture: somaclonal variation and selection. *Plant Cell Rep*, 1281-1285.
- WATT, M. P. (2012). The status of temporary immersion system (TIS) technology for plant micropropagation. *African Journal of Biotechnology*, 11(76): 14025-14035.
- WILKEN, D., GONZALEZ, E. J., GERTH, A., GOMES-KOSKY, R., SCHUMANN, A., e CLAUS, D. (2014). Effect of immersion systems, lighting, and TIS designs on biomass increase in micropropagating banana (*Musa* spp. cv. 'Grande naine' AAA). *In Vitro Cell.Dev.Biol.*
- WOOLFE, J. A. (1992). The contribution of sweetpotato and its products to human diet. In: J. A. HILL, C. K. BONSE, & P. A. LORETAN, *Sweet potato technology for the 21st century* (pp. 367-380). Tuskegee: Tuskegee University.
- XIAO, Y., NIU, G., e KOZAI, T. (2011). Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 149-158.
- ZANANDREA, I., BACARIN, M. A., SCHIMITZ, D. D., BRAGA, E. J. B., e PETERS, J. A. (2006). Chlorophyll fluorescence in in vitro cultivated apple. *Revista Brasileira de Agrociência*, 12 (3): 305-308.
- ZHU, L. H., LI, X. Y., e WELANDER, M. (2005). Optimisation of growing conditions for the apple rootstock M26 grown in RITA containers using temporary immersion principle. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 81: 313-318.
- ZIV, M. (2000). Bioreactor Technology for Plant Micropropagation. *Horticultural Reviews*, 24:1-30.
- ZOBAYED, F. A., ZOBAYED, S. M., KUBOTA, C., KOZAI, T., e HASEGAWA, O. (2000). A combination of vermiculite and paper pulp supporting material for the photoautotrophic micropropagation of sweet potato. *Plant science*, 157:225-231.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A montagem e funcionamento do sistema de biorreator de imersão temporária no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas é um legado para continuidade dos trabalhos em cultura de tecidos de plantas, tanto no aspecto empresarial, visto que uma empresa está se estabelecendo como uma incubadora no laboratório, bem como para as pesquisas envolvendo espécies de interesse econômico para a região. As experiências iniciais, com amora-preta, framboesa e macieira evidenciaram a eficiência do referido sistema no aumento da multiplicação destas espécies. Em relação à batata-doce, cuja expressão econômica não é tão relevante, embora sua importância como fonte de carboidratos, aminoácidos e vitaminas, as respostas obtidas não foram tão expressivas como tem sido salientado em inúmeros trabalhos científicos. No entanto, levando em consideração que este é o primeiro estudo desta cultura com SIT, novos experimentos deverão ser realizados, quanto a tempo e número de imersões, densidade de explantes, composição mineral dos meios, balanço de reguladores de crescimento, densidade de fluxo de fótons entre outros, visando adequar um protocolo que seja mais responsivo para esta espécie, tornando assim o sistema SIT promissor e passível de ser utilizado na propagação comercial da mesma.

Convém salientar que além do SIT com recipientes com volumes de 5L, também foi testado e aprovado a construção de microbiorreatores, utilizando frascos menores de vidros (volume de 800mL), possibilitando assim estudos científicos quando a quantidade de explantes existentes em cultura são insuficientes para realizados experimentos envolvendo vários fatores.

Por fim, os biorreatores agora em funcionamento no laboratório, também poderão alavancar novas pesquisas, envolvendo produção de metabólicos secundários, estudos de fisiologia e anatomia de plantas desenvolvidas neste sistema de cultivo.