

a
b
c
t
p



Nº 26

DEZEMBRO DE 1996

58 L 805



Ao se aproximar o término do ano, desejamos aos associados os votos de boas festas junto com os nossos agradecimentos pela colaboração dispensada.

Informamos que a anuidade da International Association for Plant Tissue Culture (IAPTC), referente ao ano de 1997, será de R\$ 30,00 (trinta reais). Os interessados em se associarem deverão efetuar o pagamento em cheque nominal à José Antonio Peters, até o dia 30 de janeiro de 1997.

Informamos também que a anuidade da Associação Brasileira de Cultura de Tecidos de Plantas (ABCTP), para o ano de 1997, será de R\$ 20,00 (vinte reais). O pagamento deverá ser efetuado em cheque nominal à ABCTP até 30 de março de 1997, remetido para o endereço de seu presidente.

NOVIDADES: Em 1997, o ABCTP NOTÍCIAS e muitas outras informações sobre biotecnologia estarão disponíveis via Internet para os associados

AGUARDEM !

AUTOMAÇÃO E RACIONALIZAÇÃO NA MICROPROPAGAÇÃO INDUSTRIAL

Miklós Fári¹ & Natoniel Franklin de Melo²

1. CODEVASF / EMBRAPA - CPATSA / AGROINVEST (Hungria), Consultor e pesquisador visitante (Agricultural Biotechnology Center, Gödöllő, Hungary),
2. EMBRAPA/CPATSA, Laboratório de Biotecnologia, BR428 Km 152 Zona Rural, Caixa Postal 23, Petrolina - PE, CEP 56.300-000
E-mail: natoniel @ cpatsa.embrapa.br

Introdução

A micropopulação de espécies de importância agrícola tem grande aplicabilidade no processo de produção industrial. A clonagem *in vitro* é um procedimento significante, na multiplicação de espécies ornamentais, frutíferas e essências florestais, tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento. Atualmente, milhares de pequenas, médias e grandes empresas produzem de 10.000 a mais de 1.000.000 de espécimes de plantas *in vitro* por ano.

Na América Latina a micropopulação industrial começou nos anos 80, existindo atualmente cerca de 105 laboratórios comerciais onde, por exemplo, em

Cuba, a capacidade de produção chega a 60 milhões de plantas por ano (Panick, 1995; Ponce, 1995).

Os principais problemas neste tipo de empreendimento são: (1) o custo de produção é relativamente alto, e (2) o valor biológico (qualidade, estabilidade genética, etc.) das mudas micropopagadas é, em certas condições, instável (Aitken-Christie, 1991).

Atualmente, a mão-de-obra representa de 50 a 75% do custo de produção (Donnan, 1986; Rajeevan & Pandey, 1986; Pachauri & Dhawan, 1989; Pierik, 1990). Na Europa, uma das possibilidades mais simples para aumentar o balanço econômico da produção é, em curto prazo, pagar baixos salários, ou seja, transferir a produção comercial para países em desenvolvimento, onde o custo da mão-de-obra é mais baixo. Outra possibilidade, em médio e longo prazo, são inovações tecnológicas através da automação e/ou robotização (Standaert de Metsenaere, 1991). Neste caso, a racionalização das fases de trabalho manuais da micropopulação pode reduzir a demanda por mão-de-obra e, consequentemente, diminuir os custos de produção (Fári & Kertész, 1995).

Este trabalho apresenta o estágio atual da tecnologia de mecanização/automação aplicados à propagação *in vitro* de espécies de interesse.

Tendências da mecanização na propagação *in vitro* em larga escala

A necessidade de minimizar custos na micropopulação industrial fez com que os pesquisadores desenvolvessem novas estratégias e equipamentos bem como, introduzissem elementos de automação com tecnologia "high tech" os quais estão sendo aceitos para utilização rotineira (Aitken-Christie, 1991).

Há três alternativas principais para o desenvolvimento da automação/mecanização (Zandvoort & Holdgate, 1991; Aitken-Christie, 1991):

(1) automação/mecanização dos procedimentos rotineiros da micropopulação (preparo de meios de cultura, repicagem das culturas e aclimatação das plantas propagadas),

(2) desenvolvimento de novas tecnologias baseadas na utilização de sistemas de propagação em meio líquido,

"ABCTP Notícias" é publicado três vezes por ano pela Associação Brasileira de Cultura de Tecidos de Plantas. A distribuição é gratuita aos sócios da ABCTP.

Qualquer pessoa ou instituição com interesse na área de cultura de tecidos e biologia celular e molecular de plantas pode se associar, remetendo o valor da anuidade (vinte reais para pessoas físicas, e cem reais para pessoas jurídicas), em cheque nominal à ABCTP, ao tesoureiro, Ariano Magalhães Junior, Universidade Federal de Pelotas, Instituto de Biologia, Departamento de Botânica, C.P. 354, CEP 96.010-900, Pelotas, RS.

Diretoria da ABCTP para o período de 1995 a 1998:

Presidente: José Antonio Peters
Secretário: Gerson Renan Fortes
Secretária adjunta: Vera Lúcia Bobrowski
Tesoureiro: Ariano Magalhães Junior

Editores: Antonio Carlos Torres
Cristiano Lacorte
Djalma M. C. Teixeira
(CNPH, C.P. 218, 70359-970, Brasília, DF)

(3) desenvolvimento de sistemas de cultivo *in vitro* alternativos.

Automação das etapas dos métodos tradicionais de cultura de tecidos

(i) *Preparo, distribuição e dosagem do meio de cultura:* A automação das etapas de preparo, distribuição e dosagem de meios de cultura é o único exemplo que encontra-se introduzido em escala comercial.

O primeiro autômato, para a distribuição e dosagem contínua do meio de cultura, foi um desenvolvimento húngaro, na primeira década de 80 (Fári, 1984; Fári, 1987). A capacidade do autômato CLONMATIC (distribuição e dosagem automática) é 720 VegBox (recipientes plásticos descartáveis pré-esterilizados) por hora (Fári *et al.*, 1985; Balogh *et al.*, 1990). Esta linha de dosagem foi conjugada, posteriormente, com uma autoclave automática da empresa holandesa PPS Ltd., com capacidade de esterilização de 50 litros por hora, controlada por um microcomputador. Um sistema similar foi desenvolvido pela Tasman Forestry Ltd., na Nova Zelândia, consistindo, basicamente, em uma linha contínua de esterilização do meio de cultura (Gleed, 1990).

(ii) *Repicagem dos explantes axilares/nodais:* Um sistema mecanizado/automatizado de repicagem de segmentos axilares foi projetado e produzido pela primeira vez por Schonstein & Johnson (1986). Em seguida, na Universidade de Waseda (Japão), Y. Miwa (1987) foi um dos primeiros pesquisadores que fizeram o plano de um robô para micropropagação. Este modelo pioneiro tinha uma capacidade moderada, com uma repicagem automática por minuto, sob condições axênicas. Dois anos após, a Toshiba Company (Fujita, 1989) desenvolveu um novo autômato de micropropagação, o qual utilizava um robô para a repicagem automática, e um novo sistema mecânico para o transporte dos segmentos e brotos repicados. Este sistema está baseado na digitalização da figura do explante através de um método de análise tridimensional do objeto. Na Austrália, também foi patenteado um sistema parcialmente automatizado para repicagem (Brown, 1988). Em 1990, Takayama descreveu, no Japão, um sistema totalmente automatizado para a repicagem dos bulbilhos de *Lilium* sp., obtidos *in vitro*. Atualmente, observa-se o aumento das pesquisas voltadas para a automação das etapas de repicagem dos segmentos nodais/axilares. Entretanto, até sua aplicação comercial na micropropagação, é

necessário aumentar a qualidade dos propágulos repicados, reduzir os custos de investimento e resolver os problemas de contaminações.

(iii) *Transplantio das plantas obtidas in vitro para o solo (aclimatação ex vitro):* A última etapa de clonagem é o transplantio e aclimatação das plantas. Este assunto foi abordado com detalhe no ABCTP Notícias No. 25.

Novas tecnologias baseadas na utilização de sistemas de propagação em meio líquido

(i) *Sistemas de cultivo em meio líquido:* A maior parte dos trabalhos para a automação da micropropagação utiliza, pelo menos parcialmente, as vantagens práticas do meio em fase líquida. As abordagens tecnológicas e os aspectos teóricos desta estratégia foram sumarizados por Zandwort & Holdgate (1991), em comparação com o sistema de cultivo em meio semi-sólido. Maene & Debergh (1985), Aitken-Christie & Jones (1987) e Vandershaege & Debergh (1988) desenvolveram e utilizaram sistemas parcialmente análogos. Por exemplo, com a aplicação do sistema semi-mecânico "shoot-hedging", Aitken-Christie & Davies (1988) conseguiram reduzir os custos de produção em 30-40%, durante um período de teste de 18 meses. Nos EUA, Tisserat & Vandercook (1985) desenvolveram um outro sistema de automação de dosagem do meio de cultura líquido, controlado através de um microcomputador. Este método permitiu uma economia de mão de obra cinco vezes menor do que o sistema tradicional. Young *et al.* (1989) desenvolveram um novo método para multiplicação das plantas sensíveis ao meio de cultura líquido. Esta tecnologia se baseia num copo especial flutuante, para manter os propágulos na superfície do meio de cultura líquido, permitindo o cultivo contínuo de espécies sensíveis à vitrificação. Outra estratégia para evitar a vitrificação é a utilização de membranas microporosas (Hamilton *et al.*, 1985; Kong & Chin, 1988; Matsumoto & Yamaguchi, 1989). Para a multiplicação de espécies dos gêneros *Nephrolepis*, *Musa* e *Cordyline*, Weathers *et al.* (1988) desenvolveram o sistema "nutrient-mist". Na década de 80, surgiram as primeiras informações sobre as investigações da utilização de biorreatores para multiplicação *in vitro*. Preil *et al.* (1990) relataram o potencial e as dificuldades desta área utilizando espécies de *Euphorbia* como modelo. No Japão, Takayama (1990) propagou com sucesso espécies bulbíferas num outro tipo de biorreator. Desta forma, parece que a propagação em

biorreatores em escala industrial seria possível num futuro próximo, principalmente com espécies bulbíferas e tuberosas como, por exemplo, *Lilium longiflorum*, *Solanum tuberosum*, *Gladiolus* sp. e *Colocasia esculenta* (Ziv, 1990).

Desenvolvimento de sistemas de cultivo in vitro alternativos.

(i) *Cultivo de meristemas axilares:* Entre 1985 e 1988, a PB Ind. (Israel) desenvolveu o sistema semi-automático VITROMATIC para multiplicação de meristemas axilares em meio líquido (Levin, 1985; Levin et al., 1988). O princípio deste equipamento baseia-se num tanque de multiplicação especial contendo um meio de cultura líquido. Os meristemas axilares multiplicam-se dentro deste tanque, passando, em seguida, por um instrumento homogeneizador automático. Os explantes obtidos por meio deste sistema são colocados automaticamente numa matriz de cultivo, dentro de um recipiente especial, para um próximo ciclo ou para emissão de raízes. O sistema VITROMATIC usa também retardantes de crescimento para obter maior qualidade com um material cada vez mais homogêneo (Ziv, 1989; Ziv, 1990).

(ii) *Cultivo de segmentos nodais:* Aitken-Christie et al. (1988) e McCown et al. (1988) observaram que no cultivo automático de segmentos nodais em meio líquido, ocorreu o desenvolvimento e a multiplicação em níveis aceitáveis em *Populus* sp., entretanto, em *Pinus radiata* este método não foi satisfatório.

(iii) *Embriogênese somática e sementes artificiais:* Um dos aspectos mais importantes da utilização da embriogênese somática, é a concepção de semente artificial. Para fins de automação, é necessário resolver muitos obstáculos fisiológicos, genéticos e tecnológicos. Redenbaugh et al. (1993) revisaram os progressos nesta área de conhecimento. Como exemplo, podemos citar o desenvolvimento feito pelo grupo de pesquisa do Dr. W. Preil, na Alemanha, demonstrando a multiplicação sincronizada dos embriões somáticos na cultura de células de *Euphorbia pulcherrima* em grande escala (Preil & Beck, 1991).

(iv) *Cultivo e multiplicação in vitro de plantas em ambiente que permita o desenvolvimento autotrófico:* Kozai (1988) foi o pioneiro do princípio de que as plantas cultivadas *in vitro* têm capacidade de assimilar CO₂ do ar atmosférico. De

acordo com esta teoria, sob certas condições *in vitro* tais como alta iluminação e alta concentração de CO₂, dentre outras, não é necessário suplementar o meio de cultura com fonte orgânica de carbono para as necessidades heterotróficas. Este autor relatou que, em *Rosa* sp. e *Lycopersicum esculentum*, sob condições controladas é possível omitir a fonte de açúcar do meio de cultura *in vitro*.

Sistema CLONER: Uma nova iniciativa de racionalização da bancada de micropopragação.

O laboratório de cultura de células e tecidos do Agricultural Biotechnological Center (ABC), Godollo-Hungria, desenvolveu trabalhos com o objetivo de reduzir os custos de mão-de-obra na micropopragação industrial. Durante os últimos cinco anos, estes trabalhos enfocaram principalmente o aperfeiçoamento do processo de manipulação dos explantes, devido representar cerca de 30-40% do custo total da mão-de-obra (Standaert-de Metsenaere, 1991).

Os critérios para o desenvolvimento da bancada foram: 1) redução eficiente da mão-de-obra na preparação dos explantes através de um processo simplificado; e 2) interação dos novos processos com tecnologias atuais de micropopragação, sob uma base razoável.

Desta forma, o grupo do ABC desenvolveu a bancada de micropopragação racionalizada CLONER, um simples e econômico tipo de câmara de fluxo laminar (Fári & Kertész, 1995). O CLONER é constituído por duas inovações: a) um dispositivo de inoculação estéril (die), e b) um dispositivo de abertura e fechamento (daf) (Fári & Kertész, 1993a; Fári & Kertész, 1993b). Este sistema possui características positivas pelos critérios biológicos e econômicos, para a micropopragação. Em escala piloto, o processo de operação com o CLONER aumentou a velocidade de repicagem, em *Gerbera*, de 3 para 8 explantes por minuto. Este modelo foi recentemente instalado no laboratório de biotecnologia da EMBRAPA-CPATSA, em colaboração com a CODEVASF (Companhia de Desenvolvimento do Vale do São Francisco), demonstrando grande praticidade nos trabalhos de pesquisa e produção, além de poder ser adaptado aos sistemas tradicionais de capelas de fluxo laminar. Desta forma, este modelo semi-automático de manipulação de explantes pode trazer possibilidades consideráveis para o desenvolvimento futuro da micropopragação.

Referências Bibliográficas

- Aitken-Christie, J., Jones, C., (1987): Towards automation: radiata pine shoot hedges in vitro. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 8: 185- 196.
- Aitken-Christie, J., Singh, A.P., Davies, H.E., (1988): Multiplication of meristematic tissue: a new tissue culture system for radiata pine. In: Hanover, J.W., Keathley, D.E. (Eds) *Genetic Manipulation of Woody Plants*. Plenum Press, New York, 413-432.
- Aitken-Christie, J. (1991): Automation. In: *Micropropagation. Technology and Application*, Debergh, P.C. and Zimmerman, R.H. (Eds.), Kluwer Academic Publ. , Dordrecht, Boston, London, pp. 363-388.
- Balogh, Z., Fári, M. and Förstrer, H. (1990): Tool and process to cultivate organisms on agar-free support systems *in vitro*. (*Eszköz és eljárás organizmusok in vitro nevelésére agarmentes hordozóközegen.*, *in Hungarian.*) Hungarian patent, No. 207529.
- Brown, F., (1988): Apparatus for and methods of cutting and/or moving plant tissue. Patent PCT/GB87/00918.
- Donnan, A., (1986): Determining and minimizing production costs. In: Zimmerman, R.H., Griesbach, R.J., Hammerschlag, F.A., Lawson, R.H. (Eds). *Tissue culture as a plant production system for horticultural crops*. Martinus Nijhoff Publ. Dordrecht, NL. 167-173.
- Fári, M. (1984): Device for plant micropropagation (*Berendezés növények mikroszaporítására*, *in Hungarian*). Hungarian Patent, No. 15742/ 84.
- Fári, M., Németh, J., and Andrásfalvy, A. (1985): Thin PVC-foil covering (TPFC), an efficient method for culture and pre-acclimatization of *in vitro* plant cultures. *Acta Horticulturae*, 212: 371-374.
- Fári, M. (1987): Development of technical and biological basis of micropropagation toward automation and industrialization. In: Moet Hennessy (Ed.) *Electronics and Management of Plants*, Paris, 55-56.
- Fári, M. and Kertész, T. (1993a): Device for opening and closing of micropropagation vessels (*Nyitó-záró szerkezet*, *in Hungarian*). Hungarian Invention, No: OTH 27724.
- Fári, M. and Kertész, T. (1993b): Device for continuous sterile Inoculation (Folyamatos steril munkaasztal, *in Hungarian*). Hungarian Invention, No: OTH 27725.
- Fári, M. and Kertész, T. (1995): CLONER^{RMB}, Rationalized Micropropagation Bench, a New Innovation Devoted to Commercial Micropropagation. Proceedings of Conference on Plant In vitro Culture in Memory of the 50th Anniversary of Gottlieb Haberlandt's Death, 1-3 September, Mosonmagyarovár, Hungary, p. 44.
- Fujita, N., (1989): Application of robotics to mass propagation system. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 25(3): 22A-47.
- Gleed, J., (1990): Overcoming constraints to successful commercial production of tissue cultured *Pinus radiata*. In: *Abstracts Conifer Biotechnology Group 5th meeting, Keynote presentations July 1990, Shell Research Ltd., Sittingbourne, UK*: 5.
- Hamilton, R., Pederson, H., Chin, C.K., (1985): Plant tissue culture on membrane rafts. *Biotechniques* 3: 96.
- Kong, Y. Chin, C.K. (1988): Culture of asparagus protoplasts on porous polypropylene membrane. *Plant Cell Reports* 7(1): 67-69.
- Kozai, T. (1988): Autotrophic (sugar free) tissue culture for promoting the growth of plantlets in vitro and for reducing biological contamination. *Int. Symp. Application of biotechnology for small industries development in developing countries*. Bangkok, Thailand, September 1988: 1-21.
- Levin, R., (1985): Process for plant tissue culture propagation. European Patent No. 0132414A2.
- Levin, R., Gaba, V., Tal, B., Hirsch, S., DeNola, D., Vasil, I.K., (1988): Automated plant tissue culture for mass propagation. *Bio / Technology* 6: 1035 - 1040..
- Maene, L., Debergh, P., (1985): Liquid medium additions to established tissue cultures to improve elongation and rooting *in vivo*. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 5: 23-33..
- Matsumoto, K., Yamaguchi, H., (1989): onwoven materials as a supporting agent for *in vitro* culture of banana protocorm - like bodies. *Tropical Agriculture* 66(1): 8-10..
- McCown, B.H., Zeldin, E.L., Pinkalla, H.A., Dedolph, R.R., (1988): Nodule culture: A developmental pathway with high potential for regeneration, automated micropropagation, and plant metabolite production from woody plants. In: Hanover, J.W., Keathley, D.E. (Eds) *Genetic Manipulation of Woody Plants*. Plenum Press N.Y. 149-166..
- Pachauri, R.K., Dhawan, V., (1989): Cost analysis of micropropagated plants. In: Dhawan, V. (Ed) *Applications of Biotechnology in Forestry and Horticulture*. Plenum Press N.Y. 275-282.
- Panick, B. (1995): Micropropagación: una herramienta productiva para América Latina.

- REDBIO'95, Puerto Iguazu - Argentina, 4 al 9 de Junio de 1995, Abstr. No RT-1.
- Pierik, R.L.M., (1990): Commercial micropropagation in Western Europe and Israel. In: Debergh, P.C., Zimmerman, R.H. (Eds) Micropropagation of horticultural crops. Kluwer Ac. Publ. Dordrecht.
- Preil, W., Florek, P., Wix, U., Beck, A., (1988): Towards mass propagation by use of bioreactors. Acta Hort. 226: 99-106.
- Ponce, J.N.P. (1995): Propagación masiva en biofábrica. REDBIO'95, Puerto Iguazu - Argentina, 4 al 9 de Junio de 1995, Abstr. No RT-5.
- Rajeevan, M.S., Pandey, R.M., (1986): Economics of mass propagatopn of papaya through tissue culture. In: Withers, L.A., Anderson, P.G., (Eds) Plant tissue culture and its agricultural applications. Butterworths London 211-215.
- Schonstein, D.N., Johnson, B.J., (1986): Method and apparatus for dividing plant material. Australian Patent PCT/AU086/00136.
- Standaert-de Metsenaere, R.E.A. (1991): Economic consideration. In: Micropropagation. Technology and Application. Debergh, P.C. and Zimmerman, R.H. (Eds.), Kluwer Academic Publ., Dordrecht, Boston, London. pp. 123-140.
- Stewart, F.C., Mapes, M.O., and Mears, K., (1958): Growth and organised development of cultured cells. II Organisation of cultures grown from freely suspended cells. Am. J. Bot. 45: 705-708.
- Takayama, S., Swedlund, B., Miwa, Y., (1990): Automated propagation of microbulbs of lilies. In:
- Vasil, I.K. (Ed) Cell culture and somatic cell genetics of plants. Vol. 8. Academic Press.
- Takayama, S., (1990): Mass propagation of plants through shake- and bioreactor-culture techniques. In: Bajaj, Y.P.S. (Ed), Tissue culture in forestry and agriculture. Vol. 15. Springer Verlag.
- Tisserat, B., Vandercook, C.E., (1985): Development of an automated plant culture system. Plant Cell Tissue Organ Culture 5: 107-117.
- Vanderschaeghe, A.M., Debergh, P.C., (1988): Automation of tissue culture manipulations in the final stages. Acta Hort. 227: 399-401.
- Weathers, P.J., Cheethan, R.D., Giles, K.L., (1988): Dramatic increases in shoot number and lengths for Musa, Cordyline and Nephrolepis using nutrient mists. Acta Hort. 230: 39-44.
- Young, R.E., Hale, A., Camper, N.D., Keese, R.J., Adelberg, J.W., (1989): An alternative mechanized plant micropropagation approach. ASAE/CSAE Paper No. 896092, ASAE, St Joseph, M.I. 49085-9659, USA..
- Zaandwert, E. and Holdgate, I. (1991): In: Intern. Congr. of Plant Biotechnology in Horticulture, Geneve, Suisse.
- Ziv, M., (1989): Enhanced shoot and cormlet proliferation in liquid cultured gladiolus buds by growth retardants. Plant Cell Tissue Organ Culture iv, M., (1990): Morphogenesis of gladiolus buds in bioreactors. Implication for scaled up propagation of genotypes. In: Nijkamp, H.J.J., Plas, L.H.W. van der, Aartrijk, J. van (Eds) Progress in Plant Cellular

CONSIDERAÇÕES SOBRE A CULTURA DE TECIDOS EM BATATA-DOCE

Antonio C. Torres & Djalma M. C. Teixeira

EMBRAPA/CNPH, Laboratório de Biologia Celular, Caixa Postal 218, Brasília-DF, CEP 70.359-970

E-mail:torres@brnet.com.br, djalma@brnet.com.br

Introdução

Segundo dados do "FAO Production Yearbook 1993" a produção mundial de batata-doce em 1993 atingiu um total de 124 milhões de toneladas, colocando esta hortaliça no 8º lugar entre todas as espécies produtoras de alimento. No Brasil, é a 3ª

hortaliça mais plantada, com 58.199 ha, detendo o 4º lugar no montante produzido, com 603.347 toneladas colhidas (IBGE 1994).

É múltipla a aplicabilidade da batata-doce, pela sua utilização na alimentação humana e animal em forma *in natura* e industrializada, e, potencialmente poderá ser usada na produção de biomassa para produção de etanol e metano (Smith e Frank 1984).

A batata-doce é uma dicotiledônea, pertencente à família Convolvulácea cujo órgão de armazenamento é classificado como raiz tuberosa e é a parte comestível da planta. É uma espécie hexaploíde ($2n=6=90$), apresentando auto-incompatibilidade (Hernandez e Miller 1964; Wang 1964) e também incompatibilidade cruzada entre