

Alternativas para a Redução de Custos na Produção de Mudas In Vitro



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Semiárido
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

Documentos 256

Alternativas para a Redução de Custos na Produção de Mudas In Vitro

*Juliana Martins Ribeiro
Márcio dos Santos Teixeira Pinto
Sílvio Lopes Teixeira*

Esta publicação está disponibilizada no endereço:
<http://www.cpatas.embrapa.br>

Exemplares da mesma podem ser adquiridos na:

Embrapa Semiárido

BR 428, km 152, Zona Rural

Caixa Postal 23 56302-970 Petrolina, PE

Fone: (87) 3866-3600 Fax: (87) 3866-3815

cpatsa.sac@embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Maria Auxiliadora Coêlho de Lima

Secretário-Executivo: Sidinei Anuniação Silva

Membros: Ana Cecília Poloni Rybka

Ana Valéria Vieira de Souza

Anderson Ramos de Oliveira

Aline Camarão Telles Biasotto

Fernanda Muniz Bez Birolo

Flávio de França Souza

Gislene Feitosa Brito Gama

José Mauro da Cunha e Castro

Juliana Martins Ribeiro

Welson Lima Simões

Supervisor editorial: Sidinei Anuniação Silva

Revisor de texto: Sidinei Anuniação Silva

Normalização bibliográfica: Sidinei Anuniação Silva

Foto da capa: Fernanda Muniz Bez Birolo

Editoração eletrônica: Nivaldo Torres dos Santos

1ª edição (2013): Formato digital

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

É permitida a reprodução parcial do conteúdo desta publicação desde que citada a fonte.

CIP - Brasil. Catalogação na publicação

Embrapa Semiárido

Ribeiro, Juliana Martins. Alternativas para a redução de custos na produção de mudas in vitro / Juliana Martins Ribeiro, Márcio dos Santos Teixeira Pinto, Silvio Lopes Teixeira. – Petrolina: Embrapa Semiárido, 2013.

24 p. (Embrapa Semiárido. Documentos, 256).

1. Biotecnologia. 2. Micropropagação. 3. Cultura de tecido. 4. Produção de mudas. I. Título. II. Série.

CDD 571.5

© Embrapa 2013

Autores

Juliana Martins Ribeiro

Bióloga, D.Sc. em Produção Vegetal, pesquisadora da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE, juliana.ribeiro@cpatsa.embrapa.br.

Márcio dos Santos Teixeira Pinto

Biólogo, Pós-Doutorando da Universidade Federal do Maranhão, São Luis, MA, marciostp@yahoo.com.br.

Silvio Lopes Teixeira

Engenheiro-agrônomo, D.Sc. em Botânica, bolsista DCR CNPq/Facepe/Embrapa Semiárido, Petrolina, PE, teixeira70@yahoo.com.br.

Apresentação

Um dos principais desafios enfrentados pela sociedade é a produção de alimentos para atender a demanda decorrente do crescimento populacional. Dentre as técnicas agrícolas que podem ser adotadas para aumentar a produção de alimentos, destaca-se a produção de mudas, uma vez que estas se constituem em componente crítico, pois é a partir de mudas de melhor qualidade que determinada cultura poderá alcançar maior produtividade.

Assim, a produção de mudas in vitro pode ser uma alternativa. Porém, a técnica, apesar de apresentar vantagens como uniformidade genética das plantas, gerar mudas livres de doenças e redução de gastos com agroquímicos, ainda tem custo elevado, o que inviabiliza a sua utilização em larga escala, principalmente quando se considera pequenos produtores.

Uma das formas de tornar a produção de mudas in vitro mais acessível é o desenvolvimento técnicas que reduzam os custos ao longo da produção sem alterar, contudo, a sua eficiência. Enfim, sem comprometer a qualidade das mudas.

Este trabalho apresenta alternativas que podem contribuir para a redução de custos no processo de produção de mudas in vitro. Substituição de componentes do meio nutritivo, substituição da autoclavagem pela esterilização química do meio nutritivo e utilização de biorreatores de imersão temporária são algumas das alternativas abordadas na publicação. Trata-se de uma boa fonte informação para aqueles que desejam ampliar seus conhecimentos acerca do tema, que deve ser amplamente discutido, pois é aderente a um dos nossos maiores desafios: a produção de alimentos em complexos cenários climáticos.

Natoniel Franklin de Melo

Chefe-Geral da Embrapa Semiárido

Sumário

Introdução	6
A Cultura de Tecidos Vegetais	7
Redução de Custos na Produção de Mudas In Vitro	8
Substituição de Componentes do Meio Nutritivo	8
Substituição da Autoclavagem pela Esterelização Química do Meio Nutritivo	11
Utilização de Biorreatores de Imersão Temporária	13
Sistema de Cultura de Tecidos Fotoautotrófico	15
Sistema de Iluminação em Salas de Crescimento	17
Considerações Finais	20
Referências	21

Alternativas para a Redução de Custos na Produção de Mudanças In Vitro

*Juliana Martins Ribeiro; Márcio dos Santos
Teixeira Pinto; Silvio Lopes Teixeira*

Introdução

A propagação comercial de plantas em laboratório teve início na década de 1970, com produção mundial estimada em 500.000.000 plantas por ano naquela época (GONZÁLEZ, 1998; PÉREZ, 1998). No Brasil, a produção comercial de mudas em laboratório é realizada por instituições como, a Biofábrica de Cacau e a Campo Biotecnologia, especializada na produção de mudas de banana (*Musa* spp.), ambas na Bahia; pela biofábrica do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE), em Pernambuco, especializada na micropropagação de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.); a Bioteca, no Mato Grosso, especializada na propagação in vitro da teca (*Tectona grandis*); a Aracruz Celulose, no Espírito Santo, especializada na micropropagação de eucalipto (*Eucalyptus* spp.); a Campo Biotecnologia Vegetal, em Paracatu, Minas Gerais, que foi criada com o objetivo de fomentar a fruticultura nacional, por meio da produção de materiais propagativos de alta qualidade genética e fitossanitária, entre outras.

Segundo Cabral (2010), somente no primeiro semestre de 2010, foram produzidas pela Biofábrica de Cacau na Bahia, aproximadamente, 1.694.131 mudas, entre cacau clonal, cacau seminal; frutíferas como: açazeiro (*Euterpe oleraceae* Mart.), cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*), graviola (*Annona muricata* L.), pitangueira (*Eugenia uniflora* L.), goiabeira (*Psidium guajava*), pinha (*Annona* sp.), jenipapeiro (*Genipa americana* L.) e cajazeira (*Spondias mombin* L.), além de essências florestais. Desse total, foram comercializadas mais de 630

mil plantas. Em 2009, foram produzidas 1.991.680 e vendidas 1.145.514 mudas. O elevado número de mudas produzidas deve-se, principalmente, à obtenção de plantas completamente livres de doenças e pragas, que é uma vantagem que favorece o comércio de plantas desta origem.

Mesmo sendo uma tecnologia com várias vantagens, a produção de mudas in vitro ainda apresenta um custo de produção elevado, o que torna necessário a busca por alternativas voltadas à redução do custo final da muda. Algumas medidas consideradas importantes para tornar uma biofábrica mais econômica são: a substituição da técnica de autoclavagem por outra mais econômica, o uso da luz solar na iluminação da sala de crescimento de plantas (PONCE et al., 2000) e a substituição de reagentes para análise (PA) por aqueles de menor custo. Kodym e Arias (2001) afirmam que apenas com a utilização da luz natural e a substituição de alguns reagentes no meio de cultura por produtos de menor custo, pode haver uma redução de até 90% no custo de produção dos laboratórios produtores de mudas.

Neste contexto, a busca por opções a fim de reduzir os custos relacionados com a produção de mudas em laboratório tem incentivado a realização de pesquisas. Baseando-se na importância da técnica de cultivo in vitro para a produção de mudas de qualidade, este trabalho apresenta algumas considerações acerca da redução do tempo e dos custos de produção de mudas em laboratório, de modo a tornar a técnica mais exequível comercialmente.

A Cultura de Tecidos Vegetais

A cultura de tecidos vegetais é uma técnica que consiste no cultivo de plantas ou partes de plantas, tais como órgãos completos, tecidos ou células em condições in vitro. É uma forma de multiplicação assexuada que se baseia na teoria da totipotência celular, segundo a qual os seres multicelulares possuem em cada uma de suas células toda informação genética necessária para a formação de um indivíduo completo (RIBEIRO; BASTOS, 2008; RIBEIRO et al., 2010). A produção de mudas em laboratório oferece uma série de vantagens, tais como (RIBEIRO et al., 2010):

- Possibilidade de multiplicação em larga escala e em curto espaço de tempo de plantas que se propagam apenas pelas técnicas convencionais.

- Utilização de espaço reduzido para a obtenção de grande quantidade de plantas.
- Obtenção de plantas completamente livres de doenças e pragas.
- Independência quase completa das condições ambientais externas.
- Elevada precisão no estabelecimento de cronogramas de produção e comercialização.
- Elevada qualidade do produto com relação à homogeneidade e vigor das plantas obtidas.

Por meio desta técnica, as plantas podem ser cultivadas em laboratório, em meio nutritivo específico, sob condições assépticas e ambiente controlado. É um método de propagação vegetativa com o qual se objetiva, sobretudo, ao aumento do número de propágulos, a limpeza clonal dos explantes e a manutenção de espécies de interesse em bancos de germoplasma. Apesar de ser considerada uma técnica de custo elevado, esse tipo de propagação é altamente desejável quando se objetiva, principalmente, a manutenção de determinada característica na planta e a produção de mudas de alta qualidade sanitária (RIBEIRO, 2010; TEIXEIRA et al., 2006; 2008).

Redução de Custos na Produção de Mudanças in vitro

Substituição de Componentes do Meio Nutritivo

Em relação aos reagentes para o preparo de meios nutritivos, normalmente são utilizados reagentes PA, por conterem quantidades reduzidas de impurezas, minimizando possíveis influências negativas de outras substâncias químicas na reação das plantas cultivadas. Entretanto, grande parte dos componentes dos meios de cultura é disponibilizada comercialmente, apresentando a mesma concentração do nutriente e com baixo custo de aquisição (RIBEIRO et al., 2012).

Nos casos específicos do nitrato de potássio e de amônio, além de serem reagentes de custo elevado, podem ser utilizados na produção de explosivos, fato que torna sua aquisição para qualquer finalidade, inclusive para o preparo de meios nutritivos, dependente de autorização do Ministério da Defesa. Além disso, reagentes com alto grau de pureza

são indispensáveis apenas para estudos de algum fenômeno específico in vitro, para a produção comercial de plantas em laboratórios, tal grau de pureza não é necessário (PRAKASH et al., 2002), uma vez adotadas técnicas eficientes de esterilização para a eliminação destas impurezas.

Na Tabela 1 é apresentada uma comparação entre valores aproximados de reagentes PA e sua versão comercial. Observa-se redução de custos de mais de 90% com a aquisição de reagentes comerciais.

Tabela 1. Comparação de valores entre reagentes PA e sua forma comercial.

Regantes	Valor
Nitrato de amônio PA	R\$ 120,00 (Kg)
Nitrato de amônio comercial	R\$ 1,06 (Kg)
Nitrato de potássio PA	R\$ 100,00 (Kg)
Nitrato de potássio comercial	R\$ 3,00 (Kg)
Ágar	R\$ 340,00 (Kg)
Ágar comercial	R\$ 9,00 (Kg)
Sacarose	R\$ 12,00 (Kg)
Açúcar cristal	R\$ 2,00 (Kg)

Ribeiro e Teixeira (2008a) realizaram experimentos com o objetivo de reduzir custos em procedimentos de micropropagação, por meio da substituição de nitrato de potássio por salitre potássico, em meio esterilizado quimicamente com hipoclorito de sódio para o cultivo de fáfia (*Pfaffia glomerata*). Os resultados obtidos após trinta dias de cultivo demonstraram não haver contaminação nos meios esterilizados quimicamente, bem como plantas com maiores comprimentos médios e biomassa fresca cultivadas nos meios nutritivos nos quais foi utilizado o salitre potássico em substituição ao nitrato de potássio PA.

O ágar, agente gelificante comumente utilizado para o preparo de meios semissólidos, caracteriza-se por ser um dos componentes de maior custo dos meios nutritivos (FERRI et al., 1998). Experimentos com o objetivo de analisar o desenvolvimento das plantas em meios nutritivos utilizando fontes alternativas ao ágar já foram realizados para diferentes espécies.

Faria et al. (2006) realizaram experimentos com o objetivo de substituir o ágar em meios nutritivos para o cultivo de *Oncidium baueri* Lindley (Orchidaceae). As análises estatísticas demonstram que os

tratamentos contendo esfagno ou areia não foram indicados para substituírem o ágar, porém, o tratamento com espuma de poliuretano picada proporcionou um ótimo enraizamento e ótimo desenvolvimento vegetativo das plântulas, sendo, portanto, uma alternativa eficiente e de menor custo para a substituição do ágar na propagação in vitro daquela orquídea.

Costa et al. (2007) avaliaram a ação do ágar e sua substituição parcial e total pelo amido de mandioca na composição de meios de cultura de bananeira (cv. Grand Naine) e abacaxizeiro (*Ananas comosus* L.) das cultivares Rio Branco e Quinari. Os autores verificaram que para o abacaxizeiro a substituição total do ágar pela fécula proporcionou resultados similares aos obtidos com o tratamento com ágar. Na combinação ágar + fécula de mandioca os resultados foram inferiores aos obtidos com os solidificantes usados isoladamente. Para a bananeira, o uso isolado ou combinado da fécula de mandioca com ágar não proporcionou melhora nas taxas de multiplicação.

Viaganó et al. (2007) obtiveram aproximadamente 90% de enraizamento in vitro do porta-enxerto de *Prunus* cv. Mr. S. 1/8, quando utilizaram vermiculita como substituto do ágar no meio de cultivo.

A sacarose é o carboidrato mais utilizado nos meios nutritivos. Este açúcar suporta, normalmente, as mais elevadas taxas de crescimento na maioria das espécies. Entretanto, outras fontes de carbono de menor custo e que apresentem a mesma eficiência que a sacarose sobre o desenvolvimento das plantas in vitro podem ser utilizadas no preparo dos meios nutritivos.

Bernardi et al. (2004) avaliaram o efeito de diferentes fontes de carbono sobre o desenvolvimento in vitro de bananeira cv. Maçã. Os autores observaram que o número médio de brotos produzidos em meio contendo açúcar cristal foi semelhante ao da sacarose PA e superior ao do açúcar mascavo. Houve redução de cerca de 50% do custo para a produção de 1 L de meio de cultura utilizando açúcar cristal como substituto da sacarose PA, bem como a manutenção da qualidade das mudas.

Ribeiro et al. (2012), no laboratório de Biotecnologia da Embrapa Semiárido, avaliaram o efeito do melado de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) sobre o desenvolvimento in vitro de bananeira Maçã e observaram que, embora o meio nutritivo à base de melado não tenha

favorecido o desenvolvimento de plantas com maiores números de folhas quando comparados com o meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), não houve diferença significativa para o número médio de raízes entre eles.

Ribeiro et al. (2013) avaliaram o efeito diferentes concentrações de rapadura, em substituição aos sais de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), sobre o desenvolvimento in vitro de bananeira 'Maçã'. Ao final de 60 dias, não houve diferença significativa entre os números médios de folhas, brotos e raízes e os números médios de explantes mortos entre os tratamentos com rapadura e o controle. Exceto para o número médio de explantes oxidados, que foi maior no tratamento contendo 75% de rapadura. Os autores concluíram que meios nutritivos com até 50% de rapadura em sua composição, sem reguladores vegetais, podem ser utilizados em substituição ao meio MS para o cultivo in vitro de bananeira.

Substituição da Autoclavagem pela Esterilização Química do Meio Nutritivo

A autoclavagem, procedimento comumente utilizado para a esterilização de vidrarias, meios de cultura e materiais cirúrgicos em laboratório (BURGER, 1988), além de ser considerado um processo dispendioso, por causa do alto custo do equipamento e do elevado consumo de energia, promove a degradação de alguns componentes do meio nutritivo (BALL, 1953; RIBEIRO et al., 2009; STREET; LOWE, 1950). Além disso, a utilização da autoclavagem como método de esterilização limita os tipos de frascos de cultura, podendo-se apenas fazer uso daqueles que suportam altas temperaturas e são, conseqüentemente, mais caros.

Uma nova abordagem que apresenta grande potencial para a redução de custos em micropropagação é a adição de hipoclorito de sódio como esterilizante químico do meio nutritivo. Com tal procedimento, objetiva-se reduzir o tempo para a esterilização de meios nutritivos, reduzir os custos de manutenção e consumo de energia pelo uso da autoclave, bem como evitar a degradação de determinados componentes do meio de cultura em altas temperaturas durante o processo de autoclavagem (TEIXEIRA et al., 2006). É um protocolo de fácil execução, que consiste na adição de uma quantidade reduzida de hipoclorito de sódio ao meio nutritivo, na água utilizada para o preparo do meio, bem como naquela utilizada para enxaguar toda a vidraria e frascos de cultivo (RIBEIRO et al., 2008).

A esterilização química de meios nutritivos com hipoclorito de sódio, além de não promover a degradação de determinados componentes do meio nutritivo e utilizar um produto de fácil aquisição e baixo custo, possibilita o uso de frascos de plástico para a cultura das plantas.

Além disso, é uma técnica que possui protocolos otimizados para meios semissólidos e líquidos que podem ser utilizados para diferentes espécies vegetais (RIBEIRO; TEIXEIRA 2008b) e não possui, até o momento, nenhuma restrição para seu uso como esterilizante químico de meios nutritivos para plantas.

Teixeira et al. (2006) utilizaram hipoclorito de sódio para a esterilização química de meio nutritivo de abacaxizeiro, em substituição ao processo de autoclavagem e, 30 dias após o cultivo, observaram que o desenvolvimento das plantas nos meios esterilizados quimicamente foi superior ao meio autoclavado quanto ao número médio de brotos e biomassa fresca das culturas. Além disso, não foram observadas contaminações nos meios esterilizados quimicamente.

Teixeira et al. (2008) utilizaram hipoclorito de sódio para a esterilização química de meio nutritivo de eucalipto, em substituição ao processo de autoclavagem e, 30 dias após o cultivo, observaram que o desenvolvimento das plantas nos meios esterilizados quimicamente foi superior ao meio autoclavado quanto ao comprimento médio de brotos. Além disso, não foram observadas contaminações nos meios esterilizados quimicamente.

Matsumoto et al. (2009) utilizaram hipoclorito de sódio para a esterilização química de meio nutritivo e frascos para o cultivo de banana e observaram que o produto foi eficiente para a esterilização tanto do meio quanto dos frascos.

Ribeiro et al. (2009) realizaram um estudo com o objetivo de determinar a influência das técnicas de esterilização de meios nutritivos (química e autoclavagem) e da concentração de sacarose sobre o desenvolvimento de calos de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen, de modo a obter um procedimento menos dispendioso e mais rápido. Os resultados obtidos após 30 dias de cultivo demonstraram não haver diferenças significativas no desenvolvimento dos calos entre os meios autoclavados e esterilizados quimicamente, sendo o fator responsável

pela diferença entre a biomassa fresca dos calos, obtida nos diferentes tratamentos, resultante apenas da variação na concentração de sacarose. Neste estudo, também ficou comprovado que a autoclavagem do meio nutritivo promove a degradação da sacarose, fato que não foi observado nos meios esterilizados quimicamente com hipoclorito de sódio.

Ribeiro et al. (2011) utilizaram hipoclorito de sódio para a esterilização química de meio nutritivo de sequoia, em substituição ao processo de autoclavagem, e observaram que, 30 dias após o cultivo, o desenvolvimento das plantas nos meios esterilizados quimicamente foi superior ao meio autoclavado quanto ao número médio de brotos. Além disso, não foram observadas contaminações nos meios esterilizados quimicamente.

Utilização de Biorreatores de Imersão Temporária

A mão de obra no processo convencional de micropropagação é responsável por 60% a 70% do custo final da muda. Sendo assim, qualquer medida que tenha como objetivo reduzir o envolvimento de mão de obra durante as etapas da micropropagação poderá contribuir significativamente para a redução do custo final da muda, tornando o processo mais econômico. Com o objetivo de reduzir o número de frascos utilizados no processo, a eliminação da necessidade de sucessivas manipulações das culturas em capela de fluxo laminar e subcultivos para os frascos de alongamento, foi desenvolvido o biorreator de imersão temporária (TEIXEIRA, 2006).

Os biorreatores de imersão temporária fazem uso de meio nutritivo líquido, permitindo a renovação do ar e nutrientes durante o cultivo, resultando, desta forma, em maior crescimento e multiplicação das plantas quando comparado com o cultivo em meio semissólido (RIBEIRO; BASTOS, 2008).

Em biorreatores de imersão temporária, o material vegetal fica temporariamente imerso no meio de cultura, caracterizando-se por ser um sistema constituído por dois frascos transparentes, tubos autoclaváveis, filtros de ar hidrofóbicos, válvulas elétricas e compressores de ar. Em um frasco fica o meio líquido, e no outro as plantas que serão cultivadas. Ambos os frascos são conectados pelo tubo, que pode ser de silicone ou de vidro, e a esterilidade do ambiente é mantida pelos filtros hidrofóbicos. Neste tipo de biorreator, a abertura da válvula elétrica faz com que o meio de cultura seja impulsionado

pelo ar comprimido para o frasco que contém o material vegetal. Após a imersão do material vegetal, o meio de cultura retorna ao frasco original (RIBEIRO; BASTOS, 2008).

De acordo com Lemos et al. (2001), a taxa de propagação das plantas cultivadas em biorreatores é 2,20 vezes maior do que o sistema de propagação in vitro tradicional. Além disso, quando comparada com a tecnologia de micropropagação tradicional, a utilização de biorreatores apresenta uma série de vantagens (TEIXEIRA, 2006), entre elas:

- Aceleração do processo de multiplicação.
- Redução significativa dos custos com mão de obra.
- Adaptabilidade a diversas espécies vegetais.
- Uniformização da produção.
- Simplicidade de montagem do sistema.
- Eliminação do estresse gasoso e mecânico.
- Redução do custo total por unidade produzida.

Além dos fatores supracitados, a utilização de computadores como sistemas de controle dos biorreatores agrega vantagens sobre o sistema convencional de micropropagação em termos de automação e economia de trabalho, resultando em uma redução significativa da mão de obra e, conseqüentemente, baixando os custos de produção.

A utilização de biorreatores para a multiplicação in vitro de diferentes espécies de plantas é uma prática bastante utilizada. Lemos et al. (2001) realizaram a micropropagação de bananeiras cv. Terra em biorreatores de imersão temporária com o objetivo de aumentar a taxa de multiplicação e diminuir os custos de produção das mudas. Os autores concluíram que, além de ser um processo de menor custo, as plantas cultivadas em biorreatores de imersão temporária apresentaram maior comprimento, produção de biomassa de 2,86 vezes maior e 2,20 vezes mais brotos do que no sistema tradicional.

Rodrigues et al. (2006) observaram que o uso biorreator de imersão temporária apresentou maior eficiência na produção de brotos de *Heliconia champneiana* Griggs cv. Splash, quando comparado com o método convencional de micropropagação para essa espécie. Ainda neste sentido, Silva et al. (2007) verificaram que o uso de biorreatores foi eficiente para a propagação de plântulas de abacaxizeiro em larga escala, produzindo, em média, 19 brotos por explante e até 200 mudas aos 45 dias de cultivo em recipientes de 1.000 mL.

Silva et al. (2010) constataram um aumento significativo na taxa de multiplicação de plantas de cana-de-açúcar quando as mesmas foram transferidas para biorreatores de imersão temporária contendo meio MS sem a adição de reguladores vegetais.

Oliveira et al. (2011) realizaram experimentos individuais com o objetivo de testar diferentes meios de cultura e combinações entre os fitorreguladores benzilaminopurina (BAP) e ácido naftaleno acético (ANA) na multiplicação de clones de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*, utilizando o biorreator de imersão temporária. A combinação 1,0 μM de BAP com 0,5 μM de ANA foi a que resultou em maiores médias em relação à massa fresca e ao número de brotos. As culturas apresentaram alto percentual de hiperhidricidade, que se configurou como um fator limitante das condições do estudo para o cultivo de *Eucalyptus* em biorreatores.

Sistema de Cultura de Tecidos Fotoautotrófico

Sistemas de micropropagação fotoautotrófica são aqueles nos quais há produção de micropropágulos sem adição de sacarose ao meio nutritivo, sob condições ambientais que favoreçam a fotossíntese (KUBOTA; TADOKORO, 1999). Algumas vantagens da micropropagação fotoautotrófica, quando comparada com o método convencional de micropropagação, incluem (ERIG; SCHUCH, 2005):

- Aumento do crescimento das plantas.
- Redução do risco de contaminação microbiana, em virtude da remoção da sacarose do meio de cultura.
- Melhoria das características fisiológicas da planta, por causa das condições ambientais de cultivo que são mais naturais.
- Redução do estresse da planta durante a aclimatização, aumentando a percentagem de sobrevivência das mudas.
- Eliminação dos custos com iluminação e redução dos custos com reparos e manutenção.
- Possibilidade de utilização de instalações simplificadas, reduzindo os custos das construções.

De acordo com Erig e Scuch (2005), algumas práticas têm sido testadas para promover o crescimento fotoautotrófico de plantas in vitro e, entre elas, destacam-se:

- Eliminação total ou parcial da sacarose do meio de cultura.
- Aumento da concentração de CO_2 e a redução da umidade relativa e da concentração de etileno do frasco de cultivo.

- Substituição do ágar por materiais de suporte fibrosos ou porosos.
- Aumento da intensidade luminosa.

A micropropagação autotrófica associada ao uso de luz natural (fotoautotrófica), permite a redução dos custos de produção de mudas diretamente, por meio da redução do gasto com energia elétrica e, indiretamente, por meio da melhoria da qualidade das mudas, reduzindo, tanto a perda de plantas durante a aclimatização, quanto a contaminação microbiana (ERIG; SCHUCH, 2005). No entanto, as pesquisas nesta área ainda são incipientes, apesar de haver fortes motivos para seu estudo e implementação no Brasil, principalmente pela grande disponibilidade de luz natural ao longo do ano e pela necessidade de alternativas para a redução de custos no setor de produção de mudas em laboratório.

Santana et al. (2008) realizaram experimentos com o objetivo de induzir estímulo do comportamento fotoautotrófico durante o enraizamento in vitro em brotações de *Annona glabra* L. Brotações oriundas de cultivo sem aeração e cultivo com aeração foram inoculadas em meio nutritivo adequado, com ou sem a adição de sacarose. Os autores observaram que a aeração dos tubos de ensaio apresentaram incrementos significativos de até 250% na matéria seca radicular. Também foi observado que a indução de raízes secundárias (laterais) em *A. glabra* só ocorreu em culturas com aeração, independentemente da presença ou ausência de sacarose no meio de cultura. Os autores concluíram que o estímulo do comportamento fotoautotrófico em *A. glabra* pode ser obtido com sucesso durante a fase de enraizamento in vitro.

Damiani e Schuch (2009) realizaram estudos para verificar a eficiência do enraizamento fotoautotrófico de mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade), cultivar Delite, comparando o efeito da luz natural e da luz artificial durante o verão e o inverno, bem como o efeito de três concentrações de sacarose adicionadas ao meio de cultura e de diferentes tipos de vedação dos frascos de cultivo. Após 60 dias, os autores observaram que o enraizamento em meio de cultura livre de sacarose promoveu o aumento do número de raízes e da porcentagem de enraizamento e, quando associado ao fechamento dos frascos com algodão, favoreceu, também, o incremento do comprimento das raízes e da massa fresca total. Quanto ao ambiente de cultivo e às épocas do ano, os autores observaram que o enraizamento ocorreu com sucesso de forma fotoautotrófica e, durante o verão, independentemente do ambiente de cultivo, houve um aumento do comprimento de raízes, da porcentagem de enraizamento e da massa fresca total.

Sistema de Iluminação em Salas de Crescimento

As lâmpadas fluorescentes são a principal fonte de luz utilizada nas salas de crescimento de laboratórios de cultura de tecidos vegetais. A iluminação das salas de crescimento é responsável por, aproximadamente, 65% do total de energia elétrica utilizada no laboratório de micropropagação, ao passo que, 25% são gastos com refrigeração, e os 10% restantes com esterilização, aquecimento, filtragem, entre outras operações de rotina. A otimização de um sistema comercial de micropropagação requer a diminuição dos gastos com energia elétrica, que é um dos principais componentes do custo de uma planta micropropagada (KOZAI; NGUYEN, 2003).

Segundo Erig e Scuch (2005), a utilização de luz natural nas salas de crescimento apresenta uma série de vantagens, entre elas:

- Eliminação dos gastos com luz artificial.
- Redução dos custos de manutenção.
- Salas de crescimento com iluminação natural são mais simplificadas, diminuindo os custos com construção.
- Diminuição dos estresses causados às plantas durante a fase de aclimatização.

Países de clima tropical, como o do Brasil, dispõem de temperatura e iluminação que possibilitam o crescimento de plantas durante todo o ano, sem a necessidade do uso de artifícios especiais. Essas características do clima brasileiro favorecem o estabelecimento de instalações mais econômicas para a produção de mudas in vitro, aproveitando as condições naturais já citadas para multiplicar plantas durante todo o ano, sem a necessidade do controle artificial de iluminação. Além disso, conforme citado anteriormente, plantas produzidas sob luz natural saem do laboratório já adaptadas ao ambiente ex vitro, não sendo necessária a etapa de aclimatização, que constitui um problema nos laboratórios tradicionais, além de poderem apresentar maior rendimento no campo (AGRAMONTE et al., 1999).

Instalações com salas de crescimento com iluminação natural já operam em Cuba há décadas, produzindo até 40.000.000 mudas de plantas por ano, como batata inglesa (*Solanum tuberosum* L.), cana-de-açúcar, plantas florestais, banana, abacaxi, mamão (*Carica papaya* L.) e outras

frutíferas, além de hortaliças (PONCE et al., 2000). A consolidação da utilização de iluminação natural em salas de crescimento para a produção de mudas deve-se ao fato de que grande parte da luz nesse tipo de construção é indireta e atravessa as paredes laterais de vidro em todas as direções. Isso garante que a luz se reflita por toda a extensão da sala de crescimento e que a sombra proveniente de qualquer estrutura que intercepte a luz, tanto no telhado quanto lateralmente, não interfira de forma negativa sobre as plantas. A Figura 1 mostra o interior da sala de crescimento de uma biofábrica para a produção de mudas de cana-de-açúcar, planejada para a utilização de luz natural nas salas de crescimento.



Foto: Juliana Martins Ribeiro.

Figura 1. Interior da sala de crescimento da Biofábrica de Campos dos Goytacazes, RJ.

O efeito de diferentes condições de luminosidade na caracterização fitotécnica de bananeira 'Prata Anã' (AABB) foram avaliados por Rocha et al. (2007). Os autores observaram uma maior eficiência na micropropagação das plantas utilizando-se luz natural em comparação com aquelas cultivadas em luz artificial na sala de crescimento

Da mesma maneira, o crescimento de *Cattleya loddigesii* "Alba x Alba" in vitro, mantida sob telas coloridas foi avaliado por Braga et al. (2007). Os autores observaram que condições de cultivo em ambiente de luz natural com proteção de telas de sombreamento azuis proporcionaram melhor crescimento de plântulas micropropagadas da espécie.

Ainda neste sentido, o efeito da iluminação natural na micropropagação de abacaxi (cv. Imperial) foi avaliado por Silva et al. (2008). Os autores observaram que o emprego da luz natural durante a fase de enraizamento in vitro proporcionou melhor desempenho agrônomico e anatômico das plantas durante a fase de aclimatização, agregando a vantagem da economia de energia elétrica para a iluminação artificial das salas de crescimento dos laboratórios de cultura de tecidos vegetais.

Quando Costa et al. (2009) avaliaram a influência de alterações no ambiente de cultivo sobre o crescimento e anatomia de bananeiras na fase de alongamento/enraizamento in vitro, concluíram que a utilização da luz natural como alternativa às lâmpadas fluorescentes, no alongamento/enraizamento in vitro, apresenta potencial para reduzir os custos de produção e promover melhorias na anatomia foliar das mudas micropropagadas.

Da mesma forma, Braga et al. (2011) avaliaram o efeito da vermiculita, ágar, da luz artificial e a da natural no enraizamento in vitro de brotos de abacaxizeiro 'Gomo de Mel', bem como caracterizaram anatomicamente essas plantas. Os autores observaram que o uso da vermiculita em luz artificial apresentou melhores resultados para todas as variáveis, exceto para número de estômatos. Para as características anatômicas, maiores espessuras dos tecidos do limbo foliar foram verificadas quando se utilizaram vermiculita e luz natural. Para o uso de ágar, também houve aumento das espessuras somente quando se utilizou o ambiente de luz natural. Quanto ao número de estômatos por mm^2 , não houve diferença significativa para os tratamentos. Maior diâmetro polar e equatorial foi observado em estômatos de folhas cultivadas em luz artificial e vermiculita, e luz natural e vermiculita, respectivamente.

A substituição de lâmpadas fluorescentes por lâmpadas de LED (diodo emissor de luz) também pode significar uma grande redução de custo com energia. LEDs são, na atualidade, as lâmpadas mais econômicas, com uma eficiência de conversão de energia elétrica em luminosa de 80%, LEDs podem produzir a mesma quantidade de luz, consumindo menos de 1/5 da quantidade de energia requerido para uma lâmpada fluorescente de igual potência luminosa. Por terem maior eficiência luminosa, produzem menos calor, o que representa uma redução indireta de custo com refrigeração. Outra vantagem proporcionada por essas lâmpadas é a facilidade em variar a intensidade luminosa e o uso de lâmpadas que emitem exatamente luz com o comprimento de onda de interesse para o crescimento vegetal.

Shin et al. (2008) cresceram plantas de orquídeas com a combinação de LEDs de luz vermelha e azul, principais espectros usados na fotossíntese. Os resultados obtidos foram comparados com os de plantas crescidas com lâmpadas fluorescentes, e foi constatado maior desenvolvimento vegetal em diversos aspectos, tais como: peso fresco, teor de pigmento nas folhas e reserva de amido nas raízes.

Considerações finais

O cultivo in vitro de plantas, apesar de apresentar uma série de vantagens quanto ao produto final, ainda é considerado uma tecnologia de custo elevado. Dentre as alternativas que podem ser adotadas para a redução de custos de produção de mudas in vitro, destacam-se a substituição de componentes PA dos meios nutritivos por sua forma comercial, a esterilização química de meios nutritivos com hipoclorito de sódio em substituição a autoclavagem, a utilização de biorreatores de imersão temporária, a adoção de sistemas fotoautotróficos para o cultivo de plantas e o uso de luz natural nas salas de crescimento.

A utilização de reagentes PA no preparo de meios nutritivos para o cultivo de plantas deve-se ao fato destes conterem quantidades reduzidas de impurezas, minimizando possíveis influências negativas de outras substâncias químicas na reação das plantas cultivadas. Entretanto, grande parte dos componentes dos meios de cultura é disponibilizada comercialmente, apresentando a mesma concentração do nutriente, quando comparado com a sua forma PA, e com baixo custo de aquisição. Uma vez adotadas técnicas eficientes de esterilização para a eliminação das impurezas, o uso de tais componentes comerciais é uma alternativa totalmente viável para a redução de custos de produção de mudas in vitro.

A esterilização química de meios nutritivos com hipoclorito de sódio, além de não promover a degradação de determinados componentes do meio nutritivo e possibilitar o uso de frascos de plástico para a cultura das plantas, faz uso de um produto de fácil aquisição e baixo custo, que é a água sanitária comercial. Além disso, é uma técnica que já possui protocolos otimizados para meios semissólidos e líquidos, que podem ser utilizados para diferentes espécies vegetais, e não possui, até o momento, nenhuma restrição para o seu uso como esterilizante químico de meios nutritivos para plantas, mostrando-se uma técnica de menor custo de alta eficiência.

A utilização de biorreatores de imersão temporária, além de promover a aceleração no processo de multiplicação das plantas, ser adaptável a diversas espécies vegetais, gerar uniformização na produção, possuir simplicidade de montagem do sistema e promover a eliminação do estresse mecânico e gasoso, faz uso de computadores como sistemas de controle dos biorreatores, o que agrega vantagens sobre o sistema convencional de micropropagação em termos de automação e economia de trabalho, resultando em uma redução significativa da mão de obra e, conseqüentemente, baixando expressivamente os custos de produção.

A micropropagação autotrófica associada ao uso da luz natural apresenta grande potencial para auxiliar na redução dos custos de produção de mudas micropropagadas, diretamente, por meio da redução do gasto com energia elétrica e, indiretamente, melhorando a qualidade das mudas, reduzindo a perda de plantas durante a aclimatização e reduzindo a contaminação microbiana.

A adoção de todas as alternativas supracitadas por biofábricas e laboratórios que produzam mudas in vitro pode representar uma redução significativa nos custos de produção e tornar esta técnica mais acessível comercialmente.

Referências

AGRAMONTE, D.; DANIELS, D.; JIMENÉZ, F.; PÉREZ, J.; PÉREZ, M.; RAMÍREZ, D.; GUTIÉRREZ, O. Efecto del tipo de iluminación en la propagación de la papa (*Solanum tuberosum* L.). **Biotechnology Vegetal**. Villa Clara, 1999, p. 138-139, 1999.

BALL, E. Hydrolysis of sucrose by autoclaving media a neglected aspect in the technique of culture of plant tissues. **Bulletin of the Torrey Botanical Club**, Lawrence, v. 80, p. 409-411, 1953.

BERNARDI, W. F.; RODRIGUES, B. I.; CASSIERE NETO, P.; ANDO, A.; TULMANN NETO, A.; CERAVOLO, L. C.; MONTES, S. M. N. M. Micropropagação de baixo custo em banana cv. Maçã em meios com diferentes fontes de carbono e avaliação da performance em campo das mudas produzidas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 26, n. 3, p. 503-506, 2004.

BRAGA, F. T.; OLIVEIRA, C.; PASQUAL, M.; CASTRO, E. M.; ALMEIDA, G. W.; DIGNART, S. L.; COSTA, L. C. B. Crescimento de *Cattleya loddigesii* "Alba x Alba" in vitro mantida sob telas coloridas. In: CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, 8., 2007. **Anais...** Caxambu: [SEB], 2007. Disponível em: <<http://www.seb-ecologia.org.br/viiiiceb/>>. Acesso em: 22 out. 2013.

BURGER, D. W. Guidelines for autoclaving liquid media used in plant tissue culture. **HortScience**, Alexandria, v. 23, p. 1.066-1.068, 1988.

CABRAL, V. **Biofábrica intensifica a produção de mudas**. Itabuna: [s.n.], 2010. Disponível em: <<http://valcabral.blogspot.com/2010/08/biofabrica-intensifica-producao-de.html>>. Acesso em: 2 set. 2010.

COSTA, F. H. S.; PEREIRA, M. A. A.; OLIVEIRA, J. P.; PEREIRA, J. E. S. Efeito de agentes geleificantes alternativos no meio de cultura no cultivo *in vitro* de abacaxizeiro e bananeira. **Revista Ciência Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 1, p. 41-46, 2007.

COSTA, F. H. da S.; PASQUAL, M.; ROCHA, H. S.; PEREIRA, J. E. S.; CASTRO, E. M. de; MIYATA, L. Y. Crescimento e anatomia foliar de bananeiras submetidas a diferentes condições de cultivo *in vitro*. **Bragantia**, Campinas, v. 68, n. 2, p. 303-311, 2009.

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Micropropagação fotoautotrófica e uso da luz natural. **Ciência Rural**, Santa Maria, RS, v. 35, n. 4, p. 961-965, 2005.

DAMIANI, C. R.; SCHUCH, M. W.. Enraizamento *in vitro* de mirtilo em condições fotoautotróficas. **Ciência Rural**, Santa Maria, RS, v. 39, n. 4, p. 1.012-1.017, 2009.

FARIA, R. T.; DALIO, R. J. D.; UNEMOTO, L. K.; SILVA, G. L. Propagação *in vitro* de *Oncidium baueri* Lindl. (Orchidaceae) sem uso de ágar. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 28, n. 1, p. 71-74, 2006.

FERRI, V. C.; CENTELLAS, A. Q.; HELBIG, V. E.; FORTES, G. R. L. Uso de ágar, amido e ácido indolbutírico no enraizamento *in vitro* do porta-enxerto de macieira MM 111. **Ciência Rural**, Santa Maria, RS, v. 18, n. 4, 1998.

GONZÁLEZ, E. A. J. Generalidades del cultivo *in vitro*. In: PONCE, J. N. P. (Ed.) **Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología**. Villa Clara: [s.n.], 1998. p. 13-24.

KODYM, A.; ZAPATA, ARIAS, F.J. Low-cost alternatives for the micropropagation of banana. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 66, p. 67-71, 2001.

KOZAI, T.; NGUYEN, Q. T. Photoautotrophic micro-propagation of woody and tropical plants. In: JAIN, S. M.; ISHII, K. **Micropropagation of woody trees and fruits**. Dordrecht: Kluwer Academic, 2003. p. 757-781.

KUBOTA, C.; TADOKORO, N. Control of microbial contamination for large-scale photoautotrophic micropropagation. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant**, New York, v. 35, p. 296-298, 1999.

LEMOS, E. E. P.; FERREIRA, M.S.; ALENCAR, L. M. C.; OLIVEIRA, J. G. L.; MAGALHÃES, V. S. Micropropagação de clones de banana cv. Terra em biorreator de imersão temporária. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 3, p. 482-487, 2001.

MATSUMOTO, K.; COELHO, M. C. F.; MONTE, D. C.; TEIXEIRA, J. B. Sterilization of non-autoclavable vessels and culture Media by sodium hypochlorite for In vitro culture. **Acta Horticulturae**, Leuven, n. 839, p. 329-335, 2009.

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

PÉREZ, P. A. O. Introduccion a la propagación masiva. In: PONCE, J. N. P. (Ed.). **Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología**. Villa Clara: [s.n.], 1998. p. 125-133.

PONCE, J. N. P.; CASTELLÁ, M. S.; PÉREZ, P. O. Posibilidades y potencial de la propagación masiva de plantas en Cuba. **Biotecnología Vegetal**. Villa Clara, n. 1, p. 3-12, 2000.

RIBEIRO, J. M.; BASTOS, D. C. **Biorreatores**: aspectos gerais e sua utilização para cultura de tecidos vegetais. Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2008. 26 p. il (Embrapa Semi-Árido. Documentos, 214). Disponível em: <http://www.cpatsa.embrapa.br:8080/public_electronica/download.php?indice=3208&seg=5226>. Acesso em: 11 maio 2013.

RIBEIRO, J. M.; TEIXEIRA, S. L. Substituição de nitrato de potássio (PA) por salitre potássico no preparo de meio de cultura de tecidos vegetais esterilizado com hipoclorito de sódio. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 4, p. 1.209-1.213, 2008a.

RIBEIRO, J. M.; CANUTO, K. M.; VESCHI, J. L. A. **Compostos clorados**: aspectos gerais e sua utilização como agente sanitizante na agricultura, micropropagação e pecuária. Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2008. 26 p. il. (Embrapa Semi-Árido. Documentos, 207). Disponível em: <http://www.cpatsa.embrapa.br:8080/public_electronica/download.php?indice=2734&seg=4752>. Acesso em: 11 maio 2013.

RIBEIRO, J. M.; TEIXEIRA, S. L. **Esterilização química de meios nutritivos para cultivo in vitro de plantas**. Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2008b. 4 p. (Embrapa Semi-Árido. Comunicado Técnico, 136). Disponível em: <http://www.cpatsa.embrapa.br:8080/public_electronica/download.php?indice=3202&seg=5220>. Acesso em: 25 fev. 2013.

RIBEIRO, J. M.; TEIXEIRA, S. L.; BASTOS, D. C. Calogênese em explantes de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen cultivados em meio nutritivo esterilizado com hipoclorito de sódio. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 56, n. 5, p. 537-541, 2009.

RIBEIRO, J. M.; BASTOS, D. C.; MELO, N. F.; OLIVEIRA, E. A. G.; PINTO, M. S. T. **Produção de mudas micropropagadas de videira, mangueira e goiabeira**. Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2010 (Embrapa Semi-Árido. Documentos, 232). Disponível em: <http://www.cpatsa.embrapa.br:8080/public_electronica/download.php?indice=3767&seg=5785>. Acesso em 22 jul. 2013.

RIBEIRO, J. M.; TEIXEIRA, S. L.; BASTOS, D. C. Cultivo *in vitro* de *Sequoia sempervirens* L. em meio de nutritivo esterilizado com hipoclorito de sódio. **Revista Ciência Florestal**, Santa Maria, RS, v. 21, n. 1, p. 79-84, 2011.

RIBEIRO, J. M.; MELO, N. F.; COELHO, A. K. N. S.; PINTO, M. S. T. Efeito do melado de cana-de-açúcar no desenvolvimento *in vitro* de bananeira (*Musa* spp.) cv. Maçã. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 59, n. 3, p. 293-298, 2012.

RIBEIRO, J. M.; MELO, N. F.; COELHO, A. K. N. S.; PINTO, M. S. T. Uso da rapadura como meio nutritivo para cultivo *in vitro* de bananeira cv. Maçã. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 60, n. 4, p. 722-725, 2013.

ROCHA, H. S.; SILVA, C. R. R.; ARAÚJO, A. G.; SILVA, A. B. Propagação *in vitro* de bananeira "Prata Anã (AABB)": intensidades luminosas e concentrações de sacarose nas fases de multiplicação e enraizamento. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, Lavras, v. 3, n. 1, p. 10-16, 2007.

RODRIGUES, P. H. V.; TEIXEIRA, F. M.; LIMA, A. M. L. P.; AMBROSANO, G. M. B. Propagação de mudas de helicônia em biorreator de imersão temporária. **Bragantia**, Campinas, v. 65, n. 1, p. 29-35, 2006.

SANTANA, J. R. F.; PAIVA, R.; PEREIRA, F. D.; OLIVEIRA, L. M. Estímulo do comportamento fotoautotrófico durante o enraizamento *in vitro* de *Annona glabra* L., I. desenvolvimento do sistema radicular e da parte aérea. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32 n. 1, p. 83-86, 2008.

SHIN, K. S.; MURTHY, H. N.; HEO, J. W.; HAHN, E. J. H.; PAK, K. Y. The effect of light quality on the growth and development of *in vitro* cultured *Doritaenopsis* plants. **Acta Physiologiae Plantarum**, [Amsterdam], v. 30, p. 339-343, 2008.

SILVA, A. B.; PASQUAL, M.; TEIXEIRA, J. B.; ARAÚJO, A. G. Métodos de micropropagação de abacaxizeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 42, n. 9, p. 1.257-1.260, 2007.

SILVA, A. B.; PASQUAL, M.; CASTRO, E. M.; MIYATA, L. Y.; MELO, L. A.; BRAGA, F. T. Luz natural na micropropagação do abacaxizeiro (*Ananas comosus* L. Meer). **Interciência**, [Caracas], v. 33, n. 11, p. 839-843, 2008.

STREET, H. E.; LOWE, J. S. The carbohydrate nutrition of tomato roots. II. The mechanism of sucrose absorption by excised roots. **Annals of Botany**, London, v. 14, p. 307-329, 1950.

TEIXEIRA, J. B. **Produção de mudas clonais em biofábricas e uso de biorreator**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 180). Disponível em: <<http://www.cenargen.embrapa.br/cip/publicacoes/doc/doc180.pdf>>. Acesso em: 21 ago. 2013.

TEIXEIRA, S. L.; RIBEIRO, J. M.; TEIXEIRA, M. T. Influence of NaClO on nutrient medium sterilization and on pineapple (*Ananas comosus* cv Smooth cayenne) behavior. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, [Amsterdam], v. 86, n. 3, p. 375-378, 2006.

TEIXEIRA, S. L.; RIBEIRO, J. M.; TEIXEIRA, M. T. Utilização de hipoclorito de sódio na esterilização de meio de cultura para multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus pellita* L. **Ciência Florestal**, Santa Maria, RS, v. 18, n. 2, p. 185-191, 2008.

VIAGANÓ, R. C.; BIANCHI, V. J.; ROCHA, P. S. G.; SCHUCH, M. W.; FACHINELLO, J. C. Enraizamento *in vitro* do porta-enxerto *Prunus* cv. Mr. S. 1/8: Concentrações de IBA em meio de cultura acrescido de ágar ou vermiculita. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 23, n. 3, p. 60-65, 2007.



Ministério da
**Agricultura, Pecuária
e Abastecimento**



CGPE 11189