UTILIZAÇÃO DO SISTEMA DE IMERSÃO TEMPORÁRIA (SIT) NA MICROPROPAGAÇÃO DA BATATA-DOCE

Palestrante: Manoel Urbano Ferreira Júnior
Engº Agrônomo
MSc Fisiologia Vegetal

Universidade Federal de Pelotas

Instituto de Biologia

Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal

UTILIZAÇÃO DO SISTEMA DE IMERSÃO TEMPORÁRIA (SIT) NA MICROPROPAGAÇÃO DA BATATA-DOCE

Mestrando: Manoel Urbano Ferreira Júnior

Orientador: José Antônio Peters

Coorientador: Leonardo Ferreira Dutra

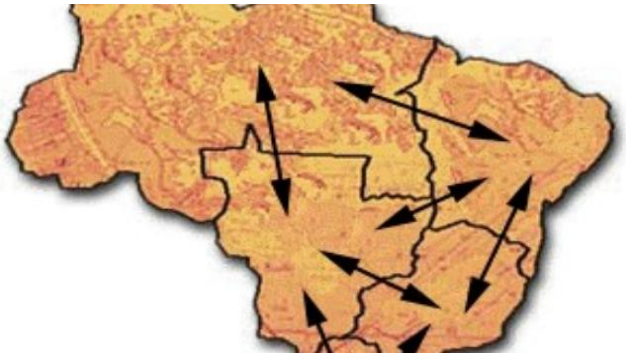
Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas

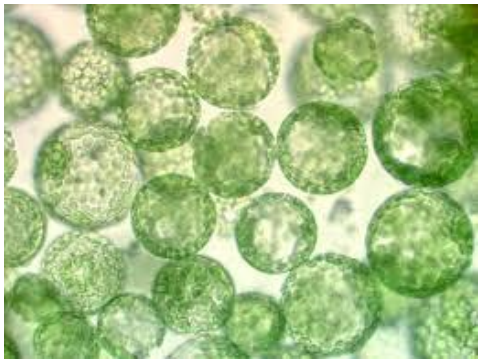
Departamento de Botânica - UFPel

PELOTAS, 2015

CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS

- **APLICABILIDADE**
  - Intercâmbio de germoplasma
  - Recuperação de híbridos interespecíficos
  - Produção de haploides e duplo-haploides
  - Metabólitos secundários
  - Indução de variabilidade genética
  - Transformação genética
  - MICROPROPAGAÇÃO





MICROPROPAGAÇÃO

- MANUTENÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS GENÉTICAS DA PLANTA-MATRIZ
- OBTENÇÃO DE PLANTAS LIVRES DE DOENÇAS (VIROSES) – MERISTEMA
- ÁPICES CAULINARES E GEMAS AXILARES

ETAPAS DA MICROPROPAGAÇÃO

MEIOS DE CULTURA

- COMPOSIÇÃO
  - ÁGUA
  - SAIS MINERAIS (INORGÂNICOS)
  - CARBOIDRATOS
  - VITAMINAS
  - REGULADORES DE CRESCIMENTO
  - SUBSTÂNCIAS COMPLEXAS

MEIOS DE CULTURA

SEMISSÓLIDO

USO DE AGENTE GELIFICANTE (ÁGAR, PHYTAGEL, GELRITE, ETC.)

LÍQUIDO

ESTACIONÁRIOS OU SOB AGITAÇÃO (CULTIVO DE ANTERAS E FUSÃO DE PROTOPLASTOS; CULTIVO DE CÉLULAS)

MEIOS DE CULTURA SEMISSÓLIDO

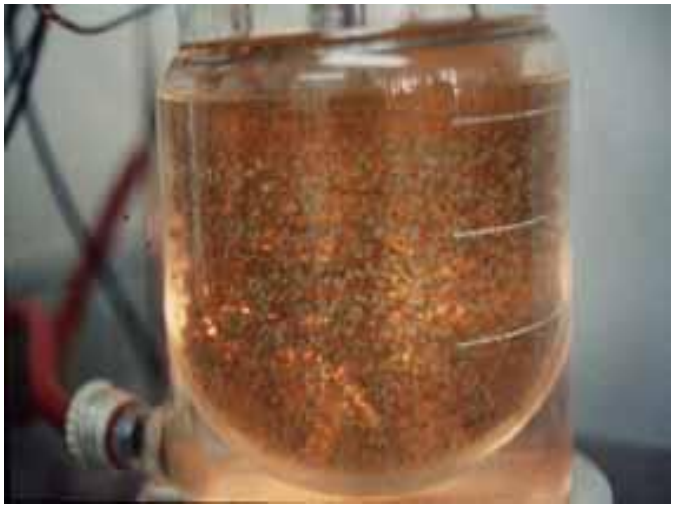
- VANTAGENS
  - Sustentação ao explante
  - Regula a difusão de água e dos nutrientes

- Desvantagens
  - Não inerte
  - Trabalho manual
  - Baixas taxas de crescimento
  - Exsudatos concentrados
  - Baixa difusão de O_2 nas raízes
  - Custo
  - Grau de automação baixo

MEIOS DE CULTURA LÍQUIDOS

- VANTAGENS
  - Custo menor em relação ao semissólido
  - Taxas mais altas de crescimento (maior contato com explante)
  - Redução dos gradientes de nutrientes e gases
- DESVANTAGENS
  - Hiperidricidade
  - Baixa taxa de aclimatização

SISTEMA DE IMERSÃO TEMPORÁRIA (SIT)



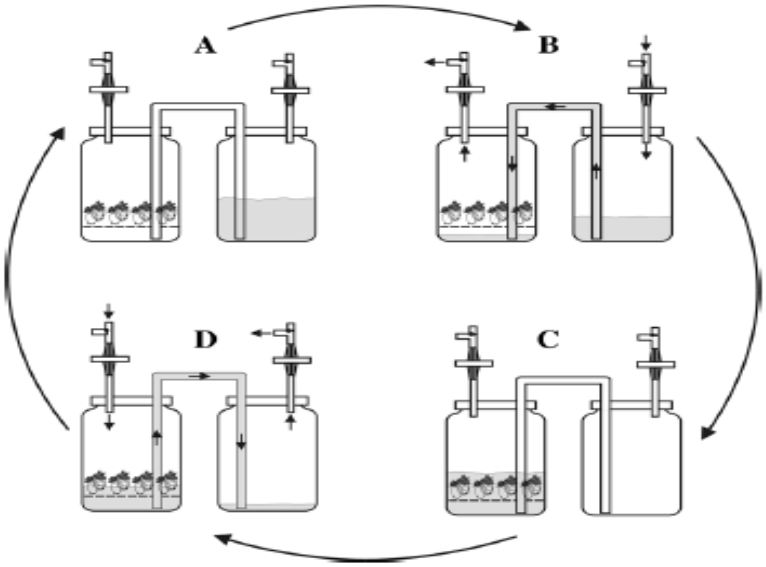
PIONEIRISMO NA CULTURA DE TECIDOS ATRAVÉS DOS SIT PARA ESTUDOS DE FISIOLOGIA E CULTIVO DE CÉLULAS E EMBRIÕES

EVOLUÇÃO DOS BIORREATORES ATUALIDADE

ATIVIDADE DO AGRONEGÓCIO E INDUSTRIAL

SIT

FUNCIONAMENTO DO BIORREATOR DE IMERSÃO TEMPORÁRIA



SIT's COMERCIAIS

A- RALM

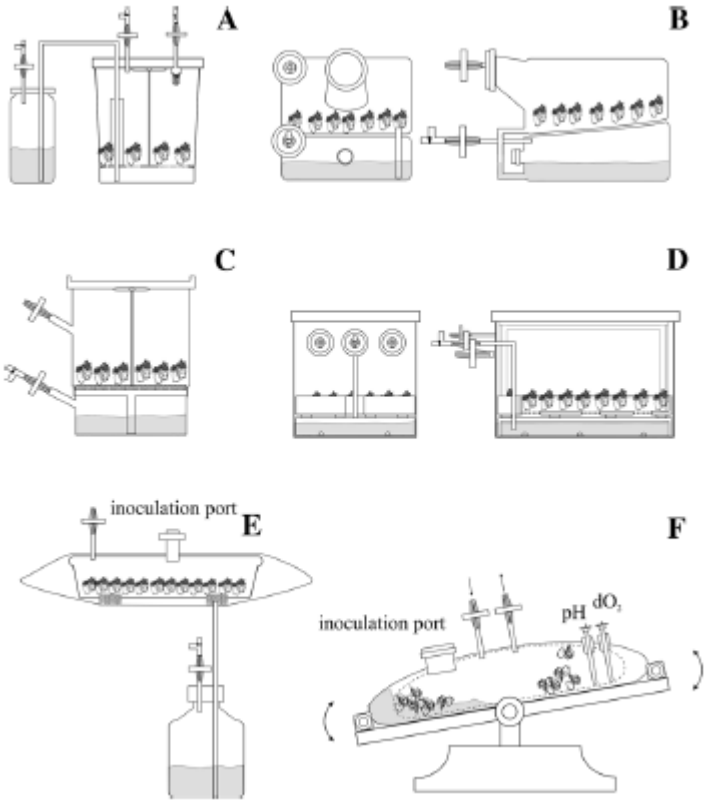
B- SETIS

C- PLANTIMA

D- PLANTFORM

E- BOX IN BAG

F- WAVE



FOTOAUTOTROFIA

PERMITEM A DISPERSÃO DE CO_2 NO INTERIOR DO VASO DE CRESCIMENTO

OBJETIVOS

- MONTAGEM E FUNCIONAMENTO DE UM SISTEMA DE IMERSÃO TEMPORÁRIA UTILIZANDO UM NOVO TIPO DE VÁLVULA: DUPLO SOLENOIDE 5/3 VIAS
- REALIZAR ESTUDOS PRELIMINARES NA MICROPROPAGAÇÃO DE BATATA-DOCE

MATERIAL VEGETAL

- BATATA-DOCE
  - Volume mundial: 110,75 milhões de toneladas (FAOSTAT, 2012)
    - China: 79,1 milhões de tonelada (FAOSTAT, 2012)
    - Brasil: 480 mil toneladas (FAOSTAT, 2012)
      - RS: 166 mil toneladas (IBGE, 2013)
  - IMPORTÂNCIA COMO CULTURA ALIMENTAR PARA POPULAÇÕES DE BAIXA RENDA
  - DISTRIBUIÇÃO DE MUDAS DE QUALIDADE AOS PROGRAMAS DE AGRICULTURA FAMILIAR

Doenças virais – principal causa de queda de produtividade

MATERIAL VEGETAL

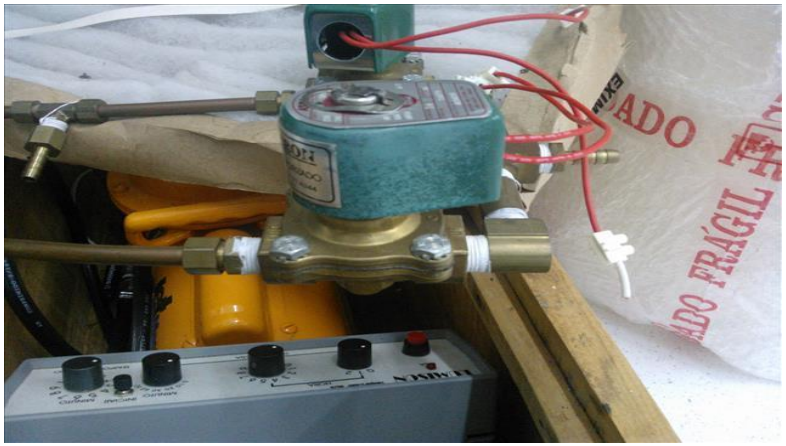
BRS - Cuia

BRS - Rubissol

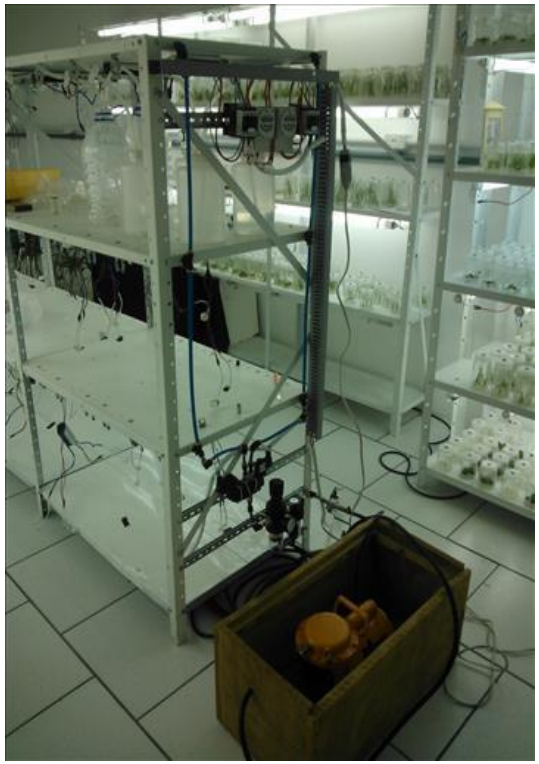
BRS - Amélia

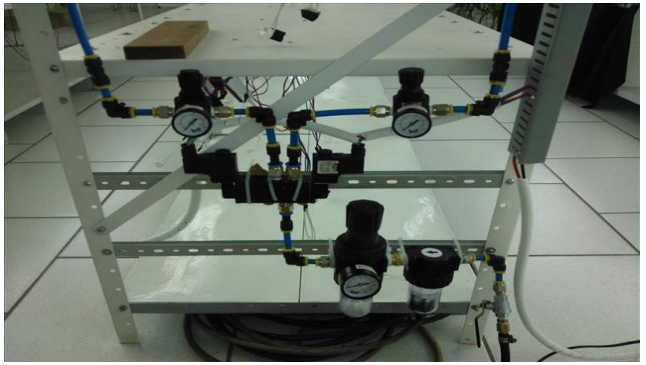
LCTP UFPel

MATERIAL DISPONÍVEL



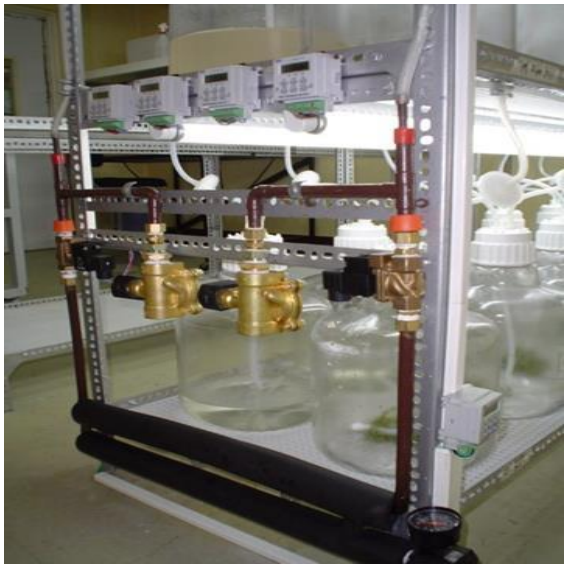
MONTAGEM DO SIT

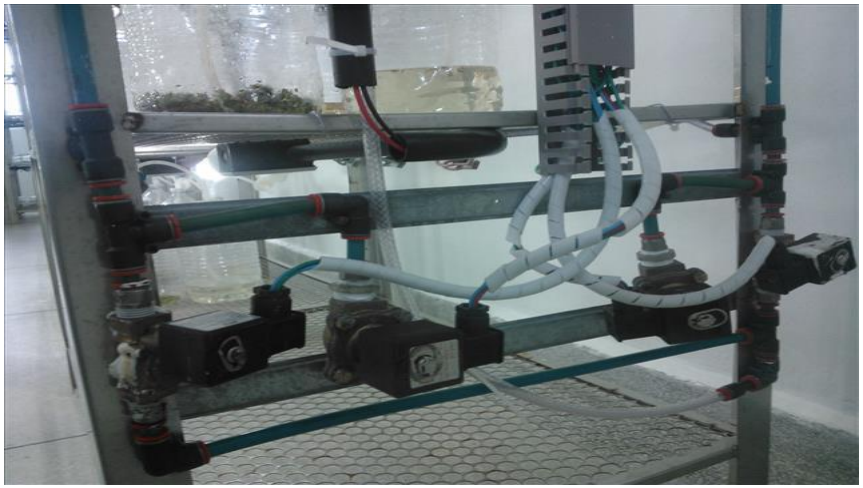




VÁLVULAS DE VIA ÚNICA

DISPOSIÇÃO DE VÁVULAS DE VIA ÚNICA





VÁLVULA DUPLO SOLENOIDE 5/3

SALA DE CRESCIMENTO DO LCTP/UFPel

BIORREATORES

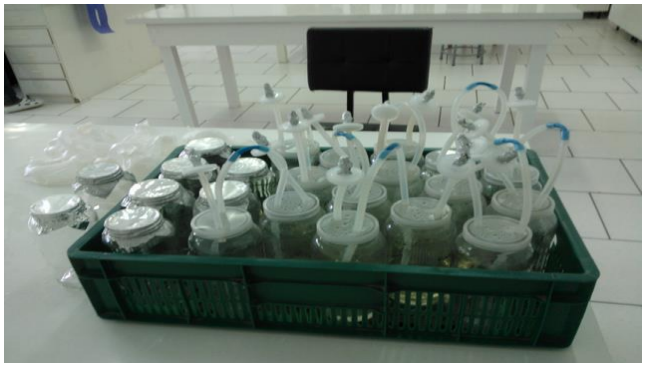
- FUNCIONAMENTO
- DESINFESTAÇÃO
  - PASTEURIZAÇÃO
  - AUTOCLAVAGEM
- TEMPOS DE IMERSÃO
- FREQUÊNCIA DE IMERSÃO

BIORREATOR CONFECCIONADO EM GARRAFA PET

PASTEURIZAÇÃO / DESINFESTAÇÃO / ENVAZAMENTO

BIORREATOR COMERCIAL RALM

MICROBIORREATOR



AUTOCLAVAGEM

EXPERIMENTOS COM BATATA-DOCE

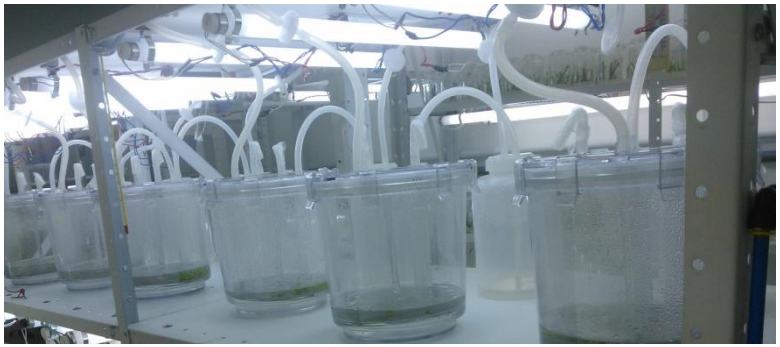
EXPERIMENTO I - MULTIPLICAÇÃO DE TRÊS cvs. NOS SISTEMAS CONVENCIONAL E SIT

- Cultivares: BRS- Cuia; BRS-Rubissol; e, BRS-Amélia
- Meio de cultura semissólido: sais e vitaminas MS; 30,0gL^{-1} de sacarose, 100mg.L^{-1} de mio-inositol, GA_3 5,0mg.L^{-1} + 0,1 mg.L^{-1} AIA ; pH entre 5,6-5,8; ágar na proporção de 6,5g.L^{-1}; autoclavagem por 20 min 121°C 1,5atm.
- Meio de cultura líquido: todos os componentes acima, exceto o ágar.
- Explante formado por segmento de ramo de aproximadamente 10,0mm de comprimento contendo entre 2 a 3 gemas axilares
- Densidade de inóculo: 5 explantes por frasco de aproximadamente 200mL em 35mL de meio para meio semissólido e 1explante a cada 50mL em meio líquido.
- O tempo de cultivo foi de 28 dias quando foram procedidas as avaliações.

EXPERIMENTOS COM BATATA-DOCE

EXPERIMENTO II - COMPARAÇÃO ENTRE DOIS SIT (DESCARTÁVEL E MANUFATURADO)

- Cultivar: BRS-Cuia
- Procedimento de produção de explantes semelhante ao descrito no item anterior
- Dois tipos de biorreatores: garrafões PET e manufaturado da empresa RALM
- Densidade de inóculo: 25 explantes em descartáveis enquanto nos biorreatores RALM, 15 explantes
- O tempo de cultivo foi de 28 dias quando foram procedidas as avaliações.



EXPERIMENTOS COM BATATA-DOCE

EXPERIMENTO III – MULTIPLICAÇÃO CONVENCIONAL EM FUNÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE E FONTES DE LUZ

- Cultivar: BRS-Cuia
- Procedimento de produção de explantes semelhante ao descrito no item anterior
- Meio de cultura semissólido conforme descrito anteriormente, variando apenas a concentração de sacarose (0,0; 7,5; 15,0; e 30,0 g L^{-1})
- Fontes de luz: fluorescente branca-fria e LED, ambas com irradiância de 36µmol.m^{-2} s^{-1}
- Foram mantido cinco explantes por frasco de, em câmara de crescimento com temperatura de 23±2°C e fotoperíodo de 16 horas por 28 dias

EXPERIMENTOS COM BATATA-DOCE

ACLIMATIZAÇÃO

- Plantas obtidas no experimento I (66 de cada cultivar)
- Transferidas para bandejas plásticas contendo substrato comercial
- Casa de vegetação
- Permanência de 3 semanas (21 dias)

RESULTADOS

RESULTADOS PRELIMINARES COM MICROBIORREATORES

CULTURA	SIT	CONVENCIONAL	TAXA DE CRESCIMENTO
FRAMBOESA	12,6	4,3	2,9
AMORA	21,6	4,0	5,4
MACIEIRA	6,3	2,9	2,2

MICROPROPAGAÇÃO DE MACIEIRA cv. Marubakaido

MICROPROPAGAÇÃO DE FRAMBOESA EM MICROBIORREATORES

BATATA-DOCE EM SIT

I- MULTIPLICAÇÃO DE TRÊS CVS. DE BATATA-DOCE CONVENCIONAL X SIT

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	

BATATA-DOCE EM SIT

COMPARATIVO ENTRE SIT's:

DESCARTÁVEL X MANUFATURADO

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.

Tipo de biorreator	Média do comprimento (mm)	Média do n° de gemas	Média do número de brotos
Descartável	35,16	6,95	1,24
Policarbonato	30,09	5,31	1,20

BATATA-DOCE EM SIT

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

Tabela 3 - Número de gemas de plantas de batata-doce, cv. BRS-Cuia, cultivadas in vitro em meio MS com diferentes concentrações de sacarose e fontes de luz, em sistema convencional.

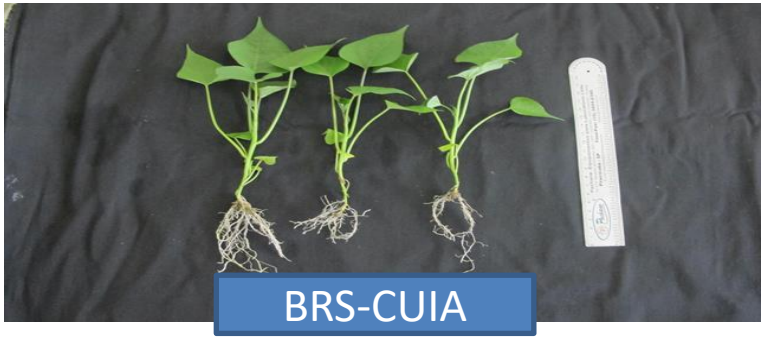
Luz	Sacarose (g L^{-1})			
	0	7,5	15	30
LED	3,44 A	4,77 A	5,80 A	4,13 A
Fluorescente	4,37 A	5,85 A	4,92 B	3,66 A
CV (%)	25,80			

BATATA-DOCE EM SIT
ACLIMATIZAÇÃO

Tabela 4 – Taxa de aclimatização de três cvs. de plantas de batata-doce, desenvolvidas em SIT e transferidas para casa de vegetação durante 21 dias.

CULTIVAR	N° de plantas semeadas	N° de plantas aptas	% de pegamento
BRS-Cuia	66	63	95,5
BRS-Rubissol	66	59	89,4
BRS-Amélia	66	25	37,9

BATATA-DOCE EM SIT
ACLIMATIZAÇÃO



BRS-CUIA

BATATA-DOCE EM SIT
ACLIMATIZAÇÃO

BRS- RUBISSOL

BATATA-DOCE EM SIT
ACLIMATIZAÇÃO

CONCLUSÕES

- SIT instalado no LCTP funciona de forma similar aos manufaturados, com custo reduzido (14% do custo de aquisição de um similar pré-instalado)
- Microbiorreatores desempenham funções semelhantes aos tradicionais, pesquisa com pouco material disponível
- Plantas de batata-doce apresentam desenvolvimento normal, com bom enraizamento, sem anomalias
- Faz-se necessário ajustes para utilização em escala comercial para a espécie estudada

CONSIDERAÇÕES FINAIS

- O uso atual de SIT em biofábricas comerciais corrobora sua economia em termos de custos com reagentes, ágar e mão de obra

- As altas taxas de multiplicação em SIT com cana-de-açúcar, abacaxi e banana diminuem sobremaneira o custo de produção destas plantas

- Faz-se necessário mais pesquisa com a cultura da batata-doce em SIT para que se consiga um CM razoável

AGRADECIMENTOS

IPA TECNOLOGIA AGRÍCOLA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS RS - BRASIL

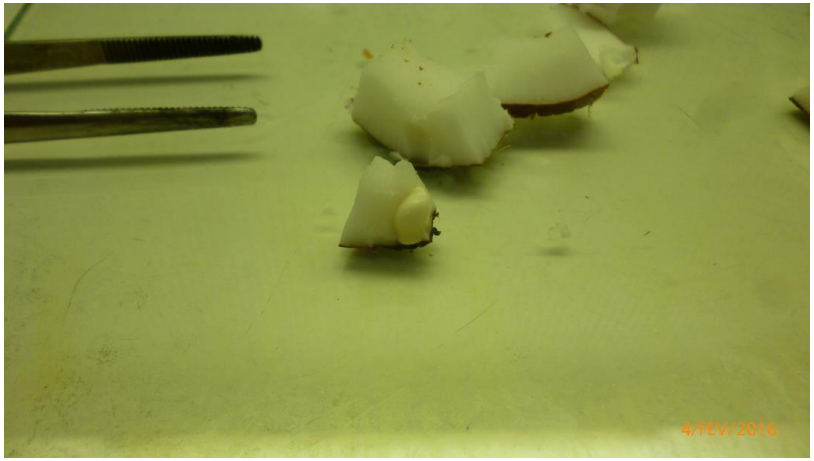
Programa de Pós-graduação FISIOLOGIA VEGETAL Departamento de Botânica - UFPel

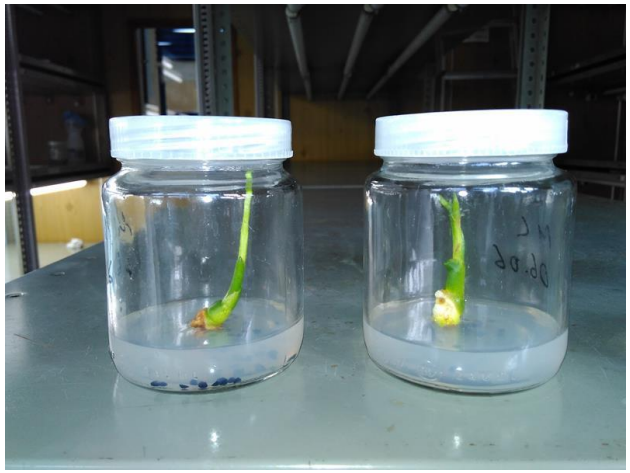
Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas
Departamento de Botânica - UFPel

PERSPECTIVAS

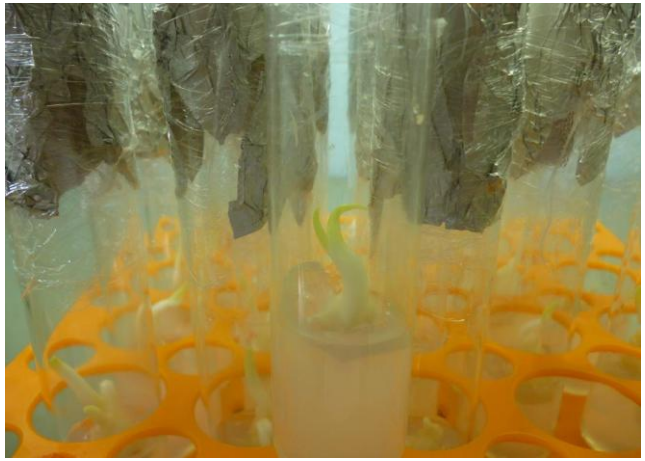
- OFERECER SUPORTE AOS COLEGAS
  - FERRAMENTA BIOTECNOLÓGICA

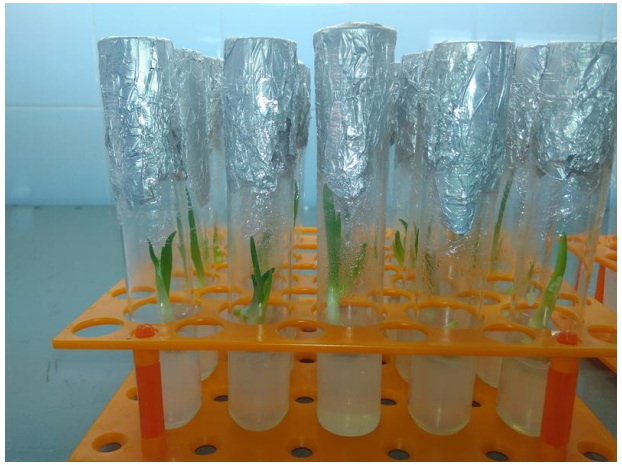
TRABALHOS ATUAIS



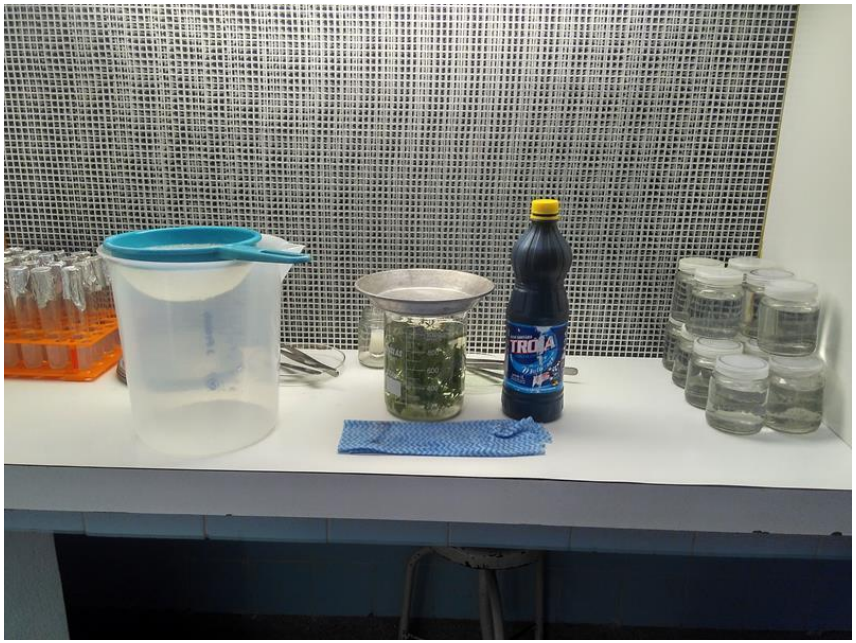


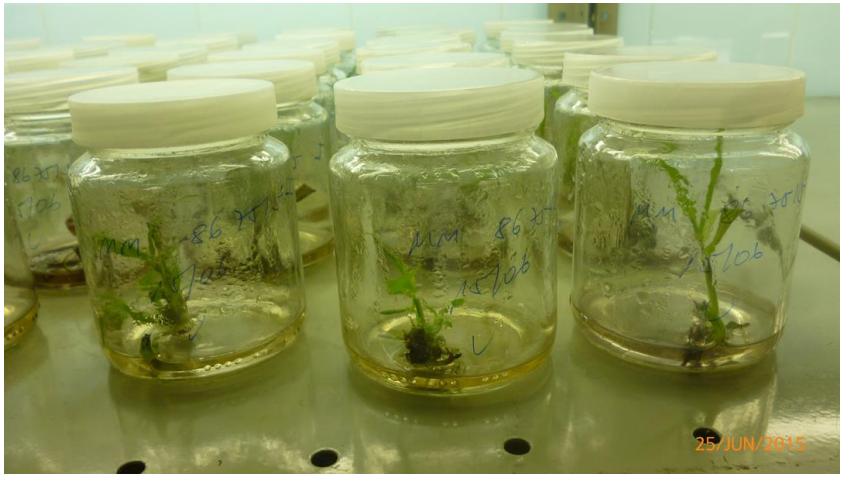
TRABALHOS ATUAIS



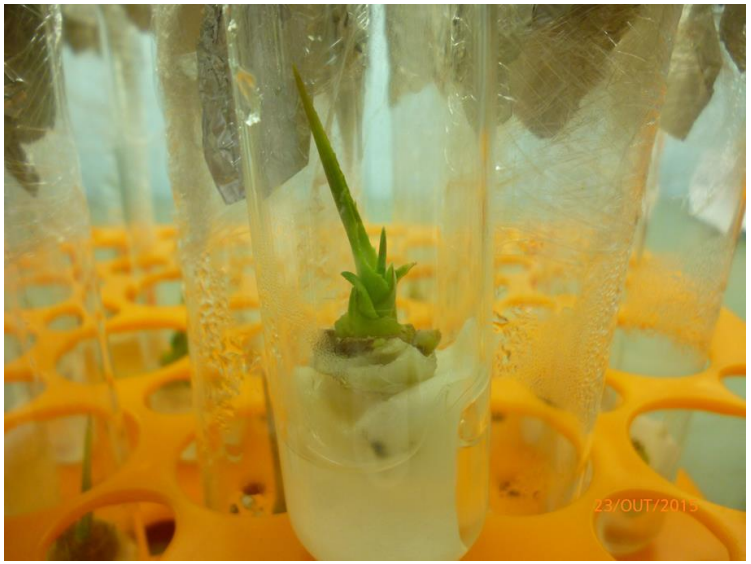


TRABALHOS ATUAIS





TRABALHOS ATUAIS



TRABALHOS ATUAIS

BIOFÁBRICA ITAPIREMA

BIOFÁBRICA ITAPIREMA

BIOFÁBRICA ITAPIREMA

ESTA É NOSSA CASA
ESTEJAMOS À
VONTADE !

manoel.urbano@ipa.br
Bloco 03
847241