

BIORREATOR DE IMERSÃO TEMPORÁRIA DESENVOLVIDO PELA EMBRAPA-RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA

TEIXEIRA, J.B.¹

¹ Embrapa-Recursos Genéticos e Biotecnologia, Cx.Postal 02372, 70.849-970, Brasília-DF, <batista@cenargen.embrapa.br>

RESUMO: A participação da mão-de-obra na produção de mudas via micropropagação pode chegar a 70% do custo final. Visando economia de mão-de-obra, a Embrapa-Recursos Genéticos e Biotecnologia deu início há alguns anos ao desenvolvimento de um biorreator de imersão temporária. Este sistema de cultivo foi escolhido tendo em vista que a maioria dos biorreatores publicados eram do tipo de imersão contínua e foram delineados para cultivo de células vegetais e de microrganismos, não constituindo a melhor alternativa para o cultivo de gemas e embriões somáticos. A construção do primeiro protótipo da Embrapa teve como referência o biorreator de imersão temporária desenvolvido pelo CIRAD, que é conhecido como sistema RITA[®]. O sistema desenvolvido pela Embrapa é composto de pares de frascos ao contrário do sistema RITA[®], o qual consiste de dois compartimentos em um só frasco. No compartimento inferior o meio de cultura fica armazenado e, no superior, é mantido o explante. No sistema desenvolvido pela Embrapa, em um frasco é estocado o meio de cultura enquanto que no outro é feito o cultivo do explante, que podem ser células, gemas ou embriões somáticos. Os pares de frascos são conectados via canalização a um sistema de válvulas solenóides, as quais controlam a direção do fluxo de ar procedente do compressor, de acordo com a programação dos temporizadores eletrônicos, aos quais são conectadas as válvulas. Após testes preliminares, verificou-se um perfeito funcionamento do sistema, o qual está sendo avaliado para cultivo de calo e embrião somático de café.

palavras-chaves: biorreator, imersão temporária, micropropagação, café.

TEMPORARY IMMERSION BIOREACTOR DEVELOPED BY EMBRAPA- GENETIC RESOURCES AND BIOTECHNOLOGY

ABSTRACT: The contribution of labor to the final cost of micropropagated seedlings can be as high as 70%. In order to reduce this cost, Embrapa-Recursos Genéticos e Biotecnologia started few years ago the development of a temporary immersion bioreactor system. This system was chosen taking in consideration

that the bioreactors found in the scientific literature were of continuous immersion models, and were designed for culturing plant cells and microorganisms, and not appropriated to culturing buds and somatic embryos. The construction of the first Embrapa prototype was based on the temporary immersion system developed by CIRAD, which is called RITA[®] system. The system developed by Embrapa has one or more pair of flasks while the RITA[®] system is constituted by a two compartment flask. The medium is kept in the lower compartment, and the explant in the upper portion of the flask. In the Embrapa system the medium is held in one flask while the explant is maintained in the other one. The flasks are connected to a solenoid valve system, which controls the air flux direction coming from the air compressor system, according to the program established by electronic timers, which are connected to the solenoid valves. After preliminary tests, we verify that the system worked very well, and is been evaluated for the culture of coffee callus and somatic embryos.

Key words: bioreactor, temporary immersion, micropropagation, coffee.

INTRODUÇÃO

O método convencional de micropropagação é altamente demandante de mão-de-obra, o que encarece o custo da muda produzida em biofábricas. Além do mais, o grande envolvimento de mão-de-obra e a intensa manipulação das culturas *in vitro* acarretam prejuízos, como perdas por contaminação e misturas varietais. Dessa forma, é necessário buscar novas alternativas de cultivo *in vitro*, e o desenvolvimento de biorreatores pode contribuir para o estabelecimento de metodologias mais adequadas, aumentando significativamente as taxas de multiplicação, bem como reduzindo o envolvimento de mão-de-obra, o que resultará numa redução substancial do custo final da muda.

Nos primeiros modelos de biorreator descritos na literatura utilizados para micropropagação, o material em cultivo permanece imerso continuamente no meio de cultura (Levin et al., 1988; Takayama et al., 1986; Preil et al., 1988). Essa imersão contínua causa problemas de hiperidratação em tecidos, órgãos e plântulas. Dependendo da espécie e do tipo de meio utilizado, a hiperidratação dos tecidos pode causar distúrbios fisiológicos sérios, que irão afetar o crescimento e desenvolvimento do material em cultivo.

Visando eliminar ou minimizar este problema, foi desenvolvido um modelo de biorreator chamado de imersão temporária (Alvard et al., 1993; Teisson et al., 1995). Neste tipo de biorreator, o meio de cultura permanece em contato com o explante por um período pré-determinado. O modelo descrito por

Alvard et al. (1993) é constituído por um frasco de dois compartimentos - um superior e um inferior-conectados entre si. O meio de cultura é colocado no compartimento inferior, e o material a ser cultivado, no superior. O meio de cultura passa do compartimento inferior para o superior pela injeção de ar no compartimento inferior. Quando todo o meio passa para o compartimento superior, ocorre borbulhamento e aeração do meio em contato com o material em cultivo. O ar é expelido através de um orifício na tampa do compartimento superior. Após um período preestabelecido, a pressão do ar no compartimento inferior é aliviada, o que, por gravidade, faz com que o meio retorne ao compartimento inferior, permanecendo aí até que o ciclo recomece. O modelo desenvolvido por Alvard et al. (1993) foi modificado no que se refere à construção, mas manteve basicamente as mesmas características de funcionamento (Etienne-Bary et al., 1999).

Na realidade, o princípio da imersão temporária para cultivo de fragmentos vegetais relativamente grandes foi primeiramente descrito por Harris & Mason (1983), os quais descreveram máquinas utilizadas para cultivo de explantes de uva em meio líquido em frascos do tipo Erlenmeyer. Durante o cultivo, o frasco era mudado de posição de tal forma que em determinada posição o explante se encontrava submerso e, em outra, não-submerso. O estoque inicial de explantes era obtido através do cultivo por 28 dias em meio com ágar. Após 90 dias de cultivo no meio de imersão temporária, a produção de brotos era sete vezes superior, comparado com o rendimento obtido pelo mesmo período em meio com ágar.

Em 1985, Tisserat & Vandercook (1985) desenvolveram um sistema de cultivo em imersão temporária que consistia de uma grande câmara de cultura, a qual era periodicamente cheia de meio de cultura. Embora o controle da troca gasosa e do pH fosse insatisfatório, este método de cultivo por imersão temporária mostrou ser muito superior aos cultivos em ágar.

Aitken-Christie & Jones (1987) utilizaram igualmente um sistema de cultivo em imersão temporária na propagação de Pinus. Neste sistema, o meio nutritivo líquido era colocado sobre o meio sólido sobre o qual estavam os explantes. O meio permanecia em contato com o explante por quatro a seis horas. Após esse período, o meio era retirado através de uma bomba de vácuo.

Pouco tempo depois, Aitken-Christie & Davies (1991) desenvolveram um sistema semi-automático de cultivo sob imersão temporária, no qual plântulas eram cultivadas em um grande recipiente com meio gelificado, com adição e remoção automática e periódica de meio líquido.

Simonton et al. (1991) desenvolveram um equipamento automático de micropropagação, no qual o meio líquido era injetado sobre as plântulas em cultivo, de acordo com um esquema de tempo preestabelecido.

Uma modificação mais recente do modelo de biorreator de imersão temporária foi feita por

Lorenzo et al. (1999) para micropropagação de gemas de cana de açúcar. Este sistema utiliza dois frascos, sendo um para cultivo do material vegetal e outro para estocagem do meio de cultura. O meio de cultura é transferido de um frasco para o outro por meio de um vácuo de 250 mm de Hg. Entretanto, não foram apresentados detalhes adicionais da construção e de funcionamento desse tipo de biorreator.

CONSTRUÇÃO

O equipamento desenvolvido pela Embrapa-Recursos Genéticos e Biotecnologia é constituído de frascos de cultivo (1,2 e 3 - Figura 1), frascos de armazenamento de meio (4,5 e 6 - Figura1), filtro de ar , com poros igual ou menor que 0,44 micrômetro (7,8,9,10,11 e 12 - Figura 1), válvulas solenóides (13,14,15,16 e 26 - Figura 1), frasco de borbulhamento com carvão ativo em suspensão aquosa (24 - Figura 1), temporizadores (19 e 20 - Figura 1), fluxômetro (21 - Figura 1), fonte de pressão positiva (tanque de ar comprimido ou cilindro de ar artificial) (22 e 25 - Fig.1), filtro de ar/óleo (23, Fig. 1) e eletrodos para monitoramento do meio (27, 28 e 29 - Figura 1).

FUNCIONAMENTO

O ar do tanque de ar comprimido (22) ou do cilindro de ar artificial (25) entra no sistema, passando inicialmente pelo filtro de ar seco (23), para remoção de óleo e partículas sólidas via válvula solenóide (26), comandado pela programação do temporizador (19). O ar, em seguida, passa pelo fluxômetro (21) antes de ser borbulhado no frasco 24. Este frasco contém carvão ativado suspenso em água deionizada, para uma segunda filtragem e umedecimento. As válvulas 13 e 15 encontram-se abertas, enquanto as de número 14 e 16 estão fechadas. Neste caso, as válvulas 13 e 15 são do tipo normalmente abertas e as de número 14 e 16, normalmente fechadas. Com isso, a pressão é exercida nos frascos de armazenamento de meio (4, 5 e 6), o que impele o meio destes frascos para os frascos de cultivo (1, 2 e 3), resultando na imersão do material em cultivo. Quando as válvulas solenóides são ligadas via temporizador (20), ocorre fechamento das válvulas (13 e 15) e abertura das válvulas (14 e 16); dessa forma o meio retorna ao frasco de armazenamento, interrompendo o período de imersão do material. Após a transferência completa do meio, o fluxo de ar é interrompido via temporizador (19), e alguns minutos após, quando a pressão do sistema tiver reduzido a zero, as válvulas solenóides são desligadas via temporizador (20), assim permanecendo até que o ciclo recomece (Figura 1).

O biorreator desenvolvido pela Embrapa, além de funcionar no sistema de imersão temporária, pode ser adaptado para funcionar sob regime de imersão contínua. O borbulhamento sob regime de imersão contínua pode ser programado de acordo com a necessidade do explante em cultivo. O funcionamento no modo de imersão contínua pode ser útil para o cultivo de células embriogênicas, como as obtidas de explantes foliares de café.

CONCLUSÃO

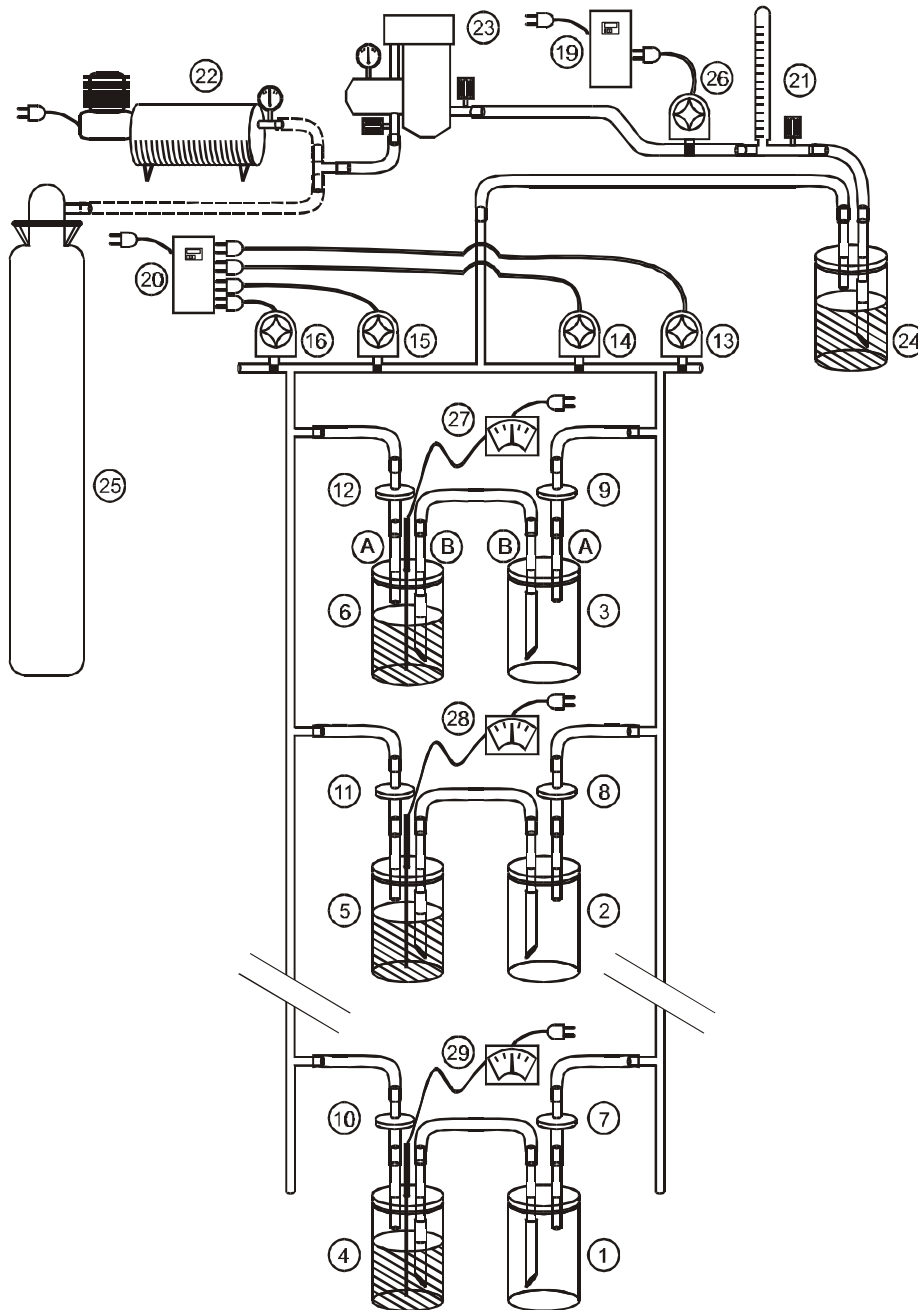
O sistema desenvolvido pela Embrapa-Recursos Genéticos e Biotecnologia apresentou resultados satisfatórios quando testado para o cultivo de gemas de abacaxi, microestacas de batata e microtuberização de batata. Alguns ajustes foram feitos na fonte de ar comprimido e no tipo de frasco, bem como no tipo de tampa dos frascos.

Os testes com uso de vácuo, apesar dos resultados satisfatórios em termos de crescimento do explante, redundaram em aumento da taxa de contaminação, o que não ocorreu quando o vácuo foi substituído por bomba compressora ou ar comprimido. O sistema está em funcionamento há mais de seis meses, sem nenhum problema aparente. Portanto, os testes de robustez, funcionamento e facilidade de manipulação já foram concluídos.

Os primeiros calos e embriões somáticos de café foram inoculados e encontram-se em cultivo. Neste primeiro teste, será avaliado o crescimento de calos embriogênicos e embriões somáticos tanto de *C. canephora* quanto de *C. arabica*. Os testes estão em fase inicial, devido à falta de calos embriogênicos e embriões somáticos que estavam sendo obtidos.

O sistema foi submetido ao INPI, para fins de patenteamento, em 28 de agosto de 2000, recebendo o número PI 0004185-8.

Figura 1 - Desenho esquemático de biorreator de imersão temporária desenvolvido pela Embrapa-Recursos Genéticos e Biotecnologia.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVARD, D.; COTE, F. & TEISSON, C. Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.32, p.55-60, 1993.
- AITKEN-CHISTIE, J. Application of bioreactor In plant propagation. In: DEBERGH, P.C. E ZIMMERMANN, R.H. (Eds.) Automation. Kluwer Academic Publishers Group, Dordrecht, Netherlands). p.363-388, 1991.
- AITKEN-CHISTIE, J. & JONES, C. Towards automation: radiata pine shoot hedges "in vitro". **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.8, p.185-196, 1987.
- ETIENNE-BARY, D. BERTRAND, B.; VASQUEZ, N. & ETIENNE, H. Direct sowing of *Coffea arabica* somatic embryos mass-produced in a bioreactor and regeneration of plants. **Plant Cell Report**, v.19, p.111-117, 1999.
- HARRIS, R.E. & MASON, E.B.B. Two machines for *in vitro* propagation of plants in liquid medium. **Canadian Journal of Plant Science**, v.63, p.311-316, 1983.
- LEVIN, R; GABA, V.; TAL, B; HIRSCH, S; DE NOLA, D & VASIL, I.K. Automated plant tissue culture for mass propagation. **Bio/Technology**, v.6, p.1035-1040, 1988;
- LORENZO, J.C.; GONZALEZ, B.L.; ESCALONA, M.; TEISSON, C. ; ESPINOSA, P. & BORROTO, C. Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.54, n.197-200, 1998.
- PREIL, W.; FLORECK, P; WIX, U. & BECK, A. Towards mass propagation by use of bioreactors. Acta Horticulturae, v.226, p.99-105, 1988;
- SIMONTON, W.; ROBACKER, C. & KRUEGER, S. A programable micropropagation apparatus using cycled liquid medium. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.27, p.211-218, 1991.
- TAKAYAMA, S.; ARIMA, Y & AKITA, M. Mass propagation of plants by fermentor culture techniques. In: Sommers, D.A.; Gengenbach, B.G.; Biesboer, D.D., Hackett, W.P. & Green, C.E. eds. Book of Abstracts. VI Intl. Cong. Plant Tissue Cultures, Univ. Minnesota, 1986. p. 449;
- TEISSON, C.; ALVARD, D.; BERTHOULY, M.; COTE, F.; ESCALANT, J.V. & ETIENNE, H. In vitro culture by temporary immersion: a new device. **Plantations**, v.2, n.5, p.32-33, 1995.
- TISSERAT, B.; VANDERCOOK, C.E. Development of an automated plant culture system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.5, p.107-117, 1985.