

Multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* cultivado em meio semissólido e em biorreator de imersão temporária

In vitro multiplication of *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* cultivated in semi-solid media and in temporary immersion

Mila Liparize de Oliveira¹, Aloisio Xavier², Ricardo Miguel Penchel³ e André Ferreira Santos⁴

Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar o cultivo de um clone de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* em meio MS semissólido (potes plásticos) e líquido (biorreatores RITA[®]) para duas relações de N-NO₃⁻ : N-NH₄⁺ (2:1 e 3:1) em três diferentes períodos de cultivo (28, 35 e 42 dias). O cultivo em biorreator RITA[®] foi superior ao meio semissólido em todas as características de crescimento avaliadas nos três períodos de cultivo estudados. Não se observou diferença entre as duas relações estudadas. O período de 35 dias de cultivo em biorreator RITA[®] foi o que promoveu maior ganho em matéria fresca e em número de brotos por explantes em comparação ao cultivo em meio semissólido nas duas relações estudadas. A hiper-hidricidade foi fator limitante para as plantas cultivadas em biorreatores, não sendo percebida nas plantas cultivadas em meio semissólido.

Palavras-chave: Micropropagação, biorreator, fontes e relações de nitrogênio

Abstract

The main objective was to evaluate the growth of a *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* clone in MS salts in semi-solid (plastic bottles) and liquid (RITA[®] bioreactors) media for two ratios of N-NO₃⁻ : N-NH₄⁺ (2:1 and 3:1) in three different growth periods (28, 35 and 42 days). Cultivation in RITA[®] bioreactor was superior to semi-solid media in all growth characteristics evaluated in the three growing periods studied. No difference was observed between the two ratios studied. The period of 35 days of cultivation in RITA[®] bioreactor promoted greater gains in fresh weight and number of shoots per explant compared to cultures using semi-solid medium in the two N-NO₃⁻ : N-NH₄⁺ ratios studied. Hyperhydricity was a main limiting factor for cultivation in bioreactors, and it was absent in cultures grown in semi-solid medium.

Keywords: Micropropagation, bioreactor, nitrogen sources and ratios

INTRODUÇÃO

A cultura de tecidos convencional via sistema ágar (meio semissólido) requer grande número de pequenos recipientes de cultivo e mão-de-obra intensiva, necessitando de ampla estrutura de câmaras de fluxo laminar, autoclave e sala de cultura, sendo essas as principais limitações da eficiência na propagação e do alto custo da técnica. Dentro desse contexto, os biorreatores podem reduzir a mão-de-obra, alcançando baixo custo de produção e estabelecendo um sistema prático para propagação massal de plantas *in vitro* (TAKAYAMA; AKITA, 2006).

O uso de biorreatores tem aumentado a produtividade e a eficiência da propagação de plantas, principalmente pelas vantagens do meio líquido. Essas vantagens devem-se ao aumento da produtividade pelo maior contato da cultura com o meio; manuseio mais simples da cultura, economia de mão-de-obra e tempo das operações; aeração forçada, que estimula o crescimento e a obtenção de maior produção vegetal; e agitação da cultura no biorreator, que resulta na perda de dominância apical e proporciona o crescimento de maior número de brotações nos explantes (TAKAYAMA; AKITA, 1994; 2006), menor tempo de subcultivo; a mudança da com-

¹Engenheira Florestal, MSc., Rua Santa Clara, 350/84, Vila Adyana, CEP: 12.243-630, São José dos Campos-SP - Email: milaliparize@yahoo.com.br

²Engenheiro Florestal, DSc., Professor Associado do Departamento de Engenharia Florestal, Universidade Federal de Viçosa, Campus Universitário, S/N, CEP: 36570-000, Viçosa-MG - Email: xavier@ufv.br

³Engenheiro Agrônomo, PhD, Pesquisador Sênior, Fibria Celulose S/A, Rodovia ES 257, Km 25, CEP: 29197-900, Aracruz-ES - Email: rp@fibria.com.br

⁴Engenheiro Agrônomo, MSc., Doutorando em Solos e Nutrição de Plantas - UFV, Rua Márcio Araújo, 154, JK, CEP: 36570-000, Viçosa-MG - Email: s.andreferreira@gmail.com

posição do meio por simples transferência e a esterilização do meio pode ser feita por ultrafiltração ou autoclavagem (ALVARD *et al.*, 1993), além de promover maior uniformidade das condições de cultivo (ETIENNE *et al.*, 2006).

Muitos estudos relatam o cultivo em biorreatores e o uso do meio líquido para diversas técnicas de cultura de tecidos em diferentes espécies, entre elas: (i) embriogênese somática de *Pinus radiata* (AITKEN-CHRISTIE *et al.*, 1988), de *Hevea brasiliensis* (ETIENNE *et al.*, 1997), de coníferas (GUPTA; TIMMIS, 2005), de café (ETIENNE *et al.*, 2006), cacau (NIEMENAK *et al.*, 2008); (ii) micropropagação de abacaxi (ESCALONA *et al.*, 1999; SILVA *et al.*, 2007), de banana (LEMOES *et al.*, 2001), de cana-de-açúcar (LORENZO *et al.*, 1998), de batata (TEISSON; ALVARD, 1999) e de helicônia (RODRIGUES *et al.*, 2006).

A grande demanda por matérias-primas florestais de qualidade, principalmente do gênero *Eucalyptus*, para produção de carvão vegetal, madeira serrada, celulose, papel entre outros, exige grande competitividade na produção de mudas destas espécies. A micropropagação e o uso de biorreatores pode se tornar desta maneira uma ferramenta importante para a produção em larga escala de mudas de genótipos superiores a preços competitivos.

O uso de biorreatores na propagação vegetativa de espécies lenhosas ainda se restringe a um pequeno número de trabalhos e espécies, porém o interesse de empresas e pesquisadores do setor têm intensificado a busca por novos protocolos que tornem esta ciência viável a espécies florestais de larga produção como as do gênero *Eucalyptus*.

As condições de cultivo em biorreatores são diferentes do cultivo em ágar, tornando necessário encontrar as condições ótimas de cultura em meio líquido (TAKAYAMA; AKITA, 2006).

Assim, este trabalho consistiu na avaliação do cultivo de um clone de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*, durante a fase de multiplicação de gemas axilares, em meio semissólido (ágar como agente gelificante) e em biorreator RITA® utilizando duas diferentes relações entre as formas de nitrogênio nítrica e amoniacal (2:1 e 3:1 de N-NO₃⁻ : N-NH₄⁺) em três períodos de cultivo.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal, meio de cultura e condições de cultivo dos explantes

O material vegetal utilizado para introdução nos biorreatores foi um clone comercial de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*, proveniente da empresa Fibria, pré-estabelecido *in vitro* em meio de cultura semissólido, tendo como recipientes de cultivo placas de Petri estéreis e descartáveis (Pleion Bioplass®) de 90 mm de diâmetro x 15 mm de altura. Essas continham 25 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), adicionado de 100 mgL⁻¹ de mio-inositol (Sigma®), 10 mgL⁻¹ de tiamina-HCl (Sigma®), 0,50 mgL⁻¹ de ácido nicotínico (Sigma®), 0,50 mgL⁻¹ de piridoxina-HCl (Sigma®), 100 mgL⁻¹ de L-glutamina (Sigma®), 0,34 mgL⁻¹ de BAP (6-benzilaminopurina - Sigma®), 0,01 mgL⁻¹ de ANA (ácido naftalenoacético - Sigma®), 30 gL⁻¹ de sacarose (Vetec®) e 7 gL⁻¹ de bacto-ágar (BD®). O pH foi ajustado para 5,8 antes da adição do ágar e da esterilização em autoclave a uma pressão de 1,5 atm e temperatura de 121 °C por 15 minutos. O material vegetal foi cultivado em prateleiras de metal aramado (Metal Stock®) com iluminação fluorescente vertical e lateral, acondicionado em sala de cultura a 24 ± 2 °C, fotoperíodo de 14 horas de luz e irradiância média de 20 μmol m⁻² s⁻¹.

calyptus grandis x *Eucalyptus urophylla*, proveniente da empresa Fibria, pré-estabelecido *in vitro* em meio de cultura semissólido, tendo como recipientes de cultivo placas de Petri estéreis e descartáveis (Pleion Bioplass®) de 90 mm de diâmetro x 15 mm de altura. Essas continham 25 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), adicionado de 100 mgL⁻¹ de mio-inositol (Sigma®), 10 mgL⁻¹ de tiamina-HCl (Sigma®), 0,50 mgL⁻¹ de ácido nicotínico (Sigma®), 0,50 mgL⁻¹ de piridoxina-HCl (Sigma®), 100 mgL⁻¹ de L-glutamina (Sigma®), 0,34 mgL⁻¹ de BAP (6-benzilaminopurina - Sigma®), 0,01 mgL⁻¹ de ANA (ácido naftalenoacético - Sigma®), 30 gL⁻¹ de sacarose (Vetec®) e 7 gL⁻¹ de bacto-ágar (BD®). O pH foi ajustado para 5,8 antes da adição do ágar e da esterilização em autoclave a uma pressão de 1,5 atm e temperatura de 121 °C por 15 minutos. O material vegetal foi cultivado em prateleiras de metal aramado (Metal Stock®) com iluminação fluorescente vertical e lateral, acondicionado em sala de cultura a 24 ± 2 °C, fotoperíodo de 14 horas de luz e irradiância média de 20 μmol m⁻² s⁻¹.

Cultivo em meio semissólido e líquido

Foram testadas duas diferentes relações entre as formas de nitrogênio N-NO₃⁻ e N-NH₄⁺ (2:1 e 3:1) no meio MS, na fase de multiplicação de gemas axilares em potes plásticos (meio semissólido - ágar) e biorreator RITA® (Vitropic S/A) (meio líquido). Essas relações foram obtidas pela modificação na concentração ou adição de diferentes sais, sem causar grande alteração na concentração original dos outros nutrientes no meio de cultura MS.

Tabela 1. Concentração dos sais presentes no meio de cultura MS original e modificado nas relações estudadas (2:1 e 3:1 de N-NO₃⁻ : N-NH₄⁺).

Table 1. Salt concentrations in the original and modified (2:1 and 3:1 ratios of N-NO₃⁻ : N-NH₄⁺) MS medium.

Sais	MS Original	1:2	1:3
	Concentração (mg L ⁻¹)		
NH ₄ NO ₃	1650,0	1650,0	1650,0
KNO ₃	1900,0	2084,1	3986,9
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	-	-	212,0
CaCl ₂ · 2H ₂ O	440,0	440,0	440,0
KH ₂ PO ₄	170,0	170,0	170,0
H ₃ BO ₃	6,2	6,2	6,2
KI	0,83	0,83	0,83
MgSO ₄ · 7H ₂ O	370,0	370,0	370,0
MnSO ₄ · H ₂ O	16,9	16,9	16,9
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8,6	8,6	8,6
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,025	0,025	0,025
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,25	0,25	0,25
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,025	0,025	0,025
FeSO ₄ · 7H ₂ O	27,85	27,8	27,8
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	37,3	37,3	37,3

Como explantes iniciais, foram utilizados brotos apicais, com matéria fresca e tamanho uniformes, de um clone de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*, estabelecidos *in vitro*, pré-cultivados sete dias antes de sua utilização para experimentação, permanecendo em placas de Petri contendo meio MS como descrito no item 2.1, sem adição de reguladores de crescimento.

Ao meio de cultura, foram adicionados 100 mgL⁻¹ de mio-inositol, 10 mgL⁻¹ de tiamina-HCl, 0,50 mgL⁻¹ de ácido nicotínico, 0,50 mgL⁻¹ de piridoxina-HCl, 0,11 mgL⁻¹ de BAP e 30 gL⁻¹ de sacarose, com pH ajustado para 5,8, antes da esterilização em autoclave a uma pressão de 1,5 atm e temperatura de 121 °C por 15 minutos.

O meio de cultura foi autoclavado diretamente dentro dos recipientes dos biorreatores utilizando-se o volume de 250 mL, para o meio líquido, e separadamente aos potes plásticos de polipropileno de volume 500 mL (Osмотec®), no cultivo em ágar. Os potes continham 100 mL de meio de cultura solidificado com 7 gL⁻¹ de bacto-ágar (BD®). Foi realizada renovação do meio de cultura a cada sete dias. O material vegetal foi acondicionado em sala de cultura a 24 ± 2 °C, fotoperíodo de 14 horas de luz e irradiância média de 20 μmol m⁻² s⁻¹.

A frequência de imersão utilizada nos biorreatores foi de duas horas por um período de oito segundos e como suporte de apoio para os explantes utilizou-se disco de esponja polimérica (Bulpren S 28133, densidade 30 Kg m⁻³) sob papel filtro qualitativo (Nº 1 - Qualy®).

O experimento foi constituído de 4 tratamentos, duas consistências do meio de cultura (líquida e semissólida) x duas relações entre N-NO₃⁻ : N-NH₄⁺ (2:1 e 3:1), obtendo-se avaliações em três idades de cultivo (28, 35 e 42 dias). Foram realizadas 20 repetições por tratamento, sendo cada repetição constituída por um explante. Cada recipiente, RITA® ou pote plástico, continha dez explantes.

Para avaliação da matéria fresca, foi realizada a pesagem dos explantes no início do período de experimentação e aos 28, 35 e 42 dias de cultivo. A avaliação do número de brotos foi realizada aos 28, 35 e 42 dias de cultivo, sendo obtida pela contagem dos brotos apresentando dois ou mais pares de folhas desenvolvidos durante o ciclo de cultivo. O percentual de hiper-hidricidade foi obtido por meio de análise visual do explante, com a contagem do número de brotos hiper-hídricos em cada explante aos 28, 35 e 42 dias de cultivo. Os dados obtidos foram analisados através de média e erro padrão da média.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O cultivo em biorreator RITA® foi superior ao ágar em todas as características avaliadas, nas duas relações N-NO₃⁻ : N-NH₄⁺ e nos três períodos de cultivo estudados (Figura 1). O período de 35 dias de cultivo em biorreator RITA® foi o que promoveu maior ganho em massa fresca e em número de brotos formados por explante inicial, em comparação com o cultivo em ágar nas duas relações estudadas. Estes resultados mostram que o cultivo em meio líquido apresenta vantagens em comparação ao cultivo em meio semissólido, como a maior taxa de crescimento das plantas cultivadas em meio líquido, onde essas são banhadas pelo meio nutritivo, o que permite rápida absorção dos nutrientes pelas células (GUPTA; TIMMIS, 2005) e melhor aproveitamento do meio (LEMOS *et al.*, 2001).

Estudos semelhantes a esse foram realizados por Reis *et al.* (2003) que obtiveram incremento de 8 vezes na massa fresca e 2,5 vezes no comprimento dos brotos de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* cultivados em biorreator RITA® em comparação ao meio semissólido. McAlister *et al.* (2005) encontraram resultados promissores no cultivo de clones de *Eucalyptus* em sistema RITA® a partir de plantas estabelecidas via sistema semissólido, e obtiveram resultados superiores aos encontrados no cultivo em meio contendo ágar, com maior taxa de multiplicação, além de o sistema RITA® promover grande proliferação de brotos dos 14 aos 18 dias, enquanto no sistema ágar, a multiplicação foi alcançada somente dos 25 aos 28 dias de cultivo. Para banana (LEMOS *et al.*, 2001) e abacaxi (SILVA *et al.*, 2007), a imersão temporária também foi um método de propagação mais eficiente comparado ao sistema tradicional.

A hiper-hidricidade foi um fator limitante para as plantas cultivadas em biorreatores, alcançando taxas muito elevadas, próximas a 100%, em todos os períodos de cultivo estudados, no entanto, não foi percebida esta desordem fisiológica nas plantas cultivadas em meio semissólido. Whitehouse *et al.* (2002) obtiveram sucesso limitado na multiplicação de gemas de *Eucalyptus* devido à hiper-hidricidade dos explantes, problema frequentemente relacionados ao uso de meio líquido. O meio líquido está associado com alta mobilidade de água e também com alta umidade relativa no ambiente *in vitro*, induzindo a presença de sintomas desta desordem. O status da água no meio de cultura está entre os fatores mais importantes afetando a hiper-hidricidade, além da concentração de reguladores de crescimento e sais contendo nitrogênio (GASPAR *et al.*, 1987; HARTMANN *et al.*, 2002).

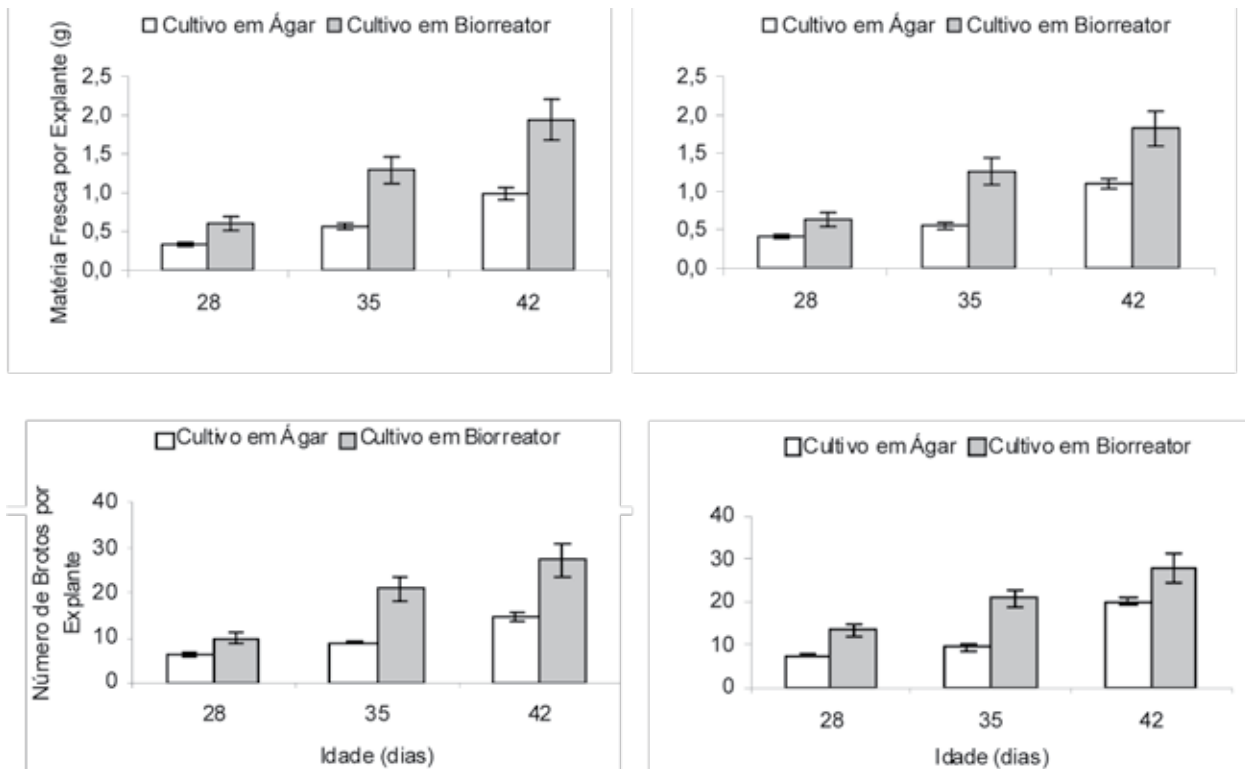


Figura 1. Produção de matéria fresca por explante na relação 2:1 de $N-NO_3^- : N-NH_4^+$ (A) e na relação 3:1 de $N-NO_3^- : N-NH_4^+$ (B), número de brotos por explante na relação 2:1 de $N-NO_3^- : N-NH_4^+$ (C) e na relação 3:1 de $N-NO_3^- : N-NH_4^+$ (D), aos 28, 35 e 42 dias de cultivo do clone de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* em meios semissólido e em biorreatores de imersão temporária RITA®. Barras verticais indicam o erro padrão da média.

Figure 1. Fresh weight production per explant in the 2:1 ratio of $N-NO_3^- : N-NH_4^+$ (A) and 3:1 ratio of $N-NO_3^- : N-NH_4^+$ (B), number of shoots per explant in 2:1 ratio of $N-NO_3^- : N-NH_4^+$ (C) and 3:1 ratio of $N-NO_3^- : N-NH_4^+$ (D), at 28, 35 and 42 days of cultivation of *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* clone in solid media and RITA® temporary immersion bioreactors. Vertical bars indicate mean standard error.

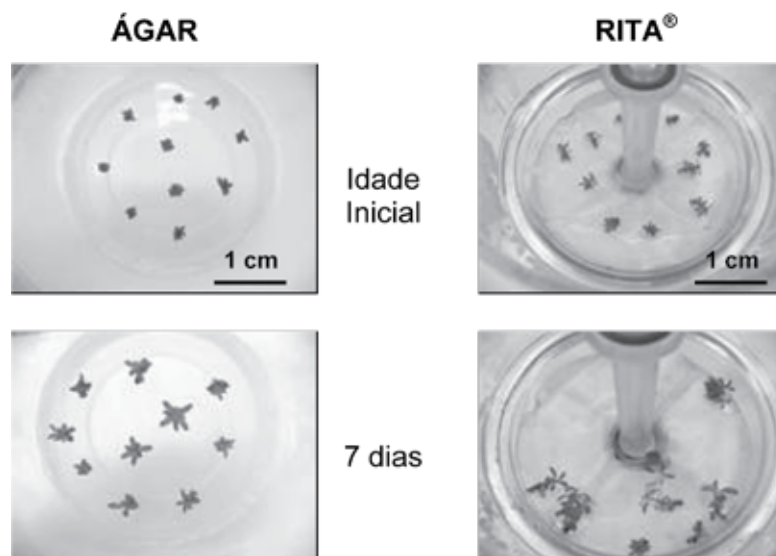


Figura 2. Padrão de brotos produzidos em meio de cultura com relação 2:1 de $N-NO_3^- : N-NH_4^+$, em dois sistemas de cultivo, semissólido e biorreator RITA®, no início do período de experimentação e aos 7, 14, 21, 28, 35 e 42 dias de cultivo do clone de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*.

Figure 2. Pattern of shoots produced in culture medium with 2:1 ratio of $N-NO_3^- : N-NH_4^+$ in both cropping systems, solid and RITA® bioreactor at the beginning at the experiment and at 7, 14, 21, 28, 35 and 42 days of *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* clone cultivation.

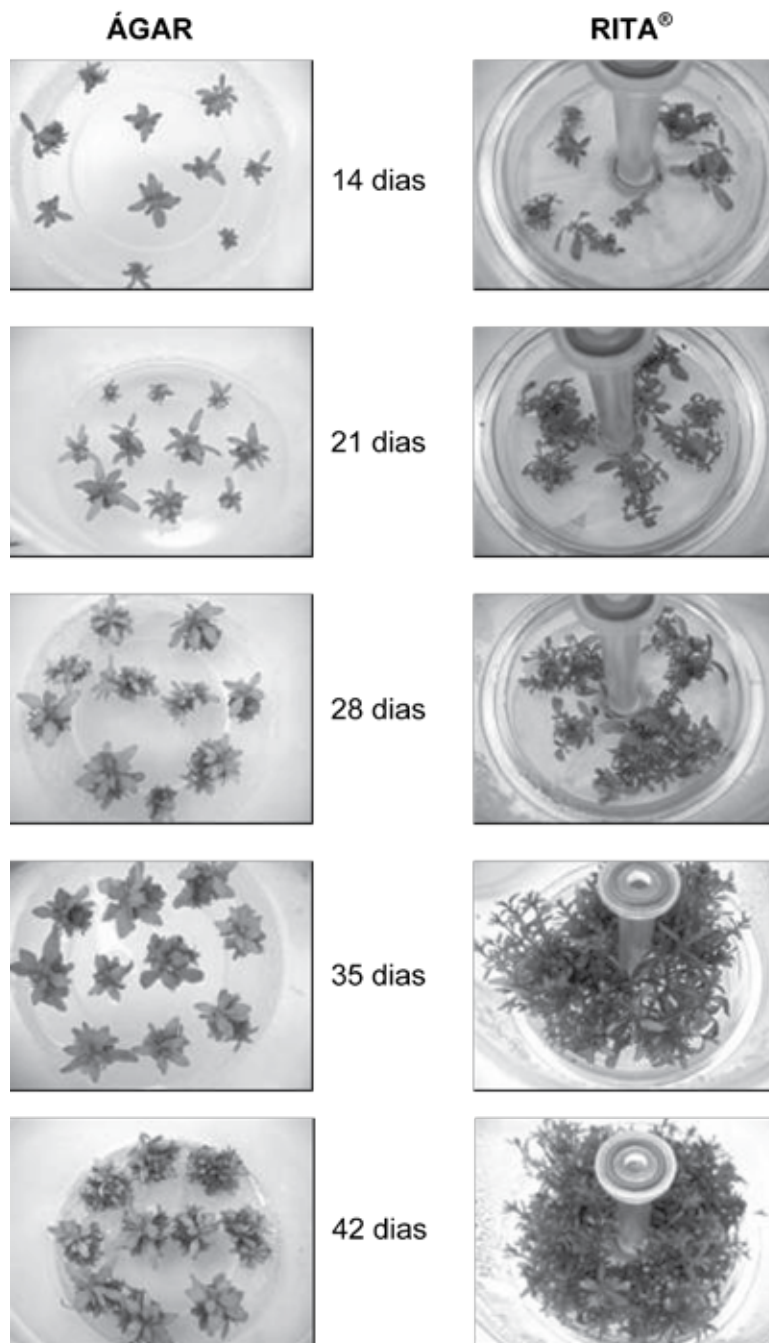


Figura 2 - Continuação. Padrão de brotos produzidos em meio de cultura com relação 2:1 de $N-NO_3^- : N-NH_4^+$, em dois sistemas de cultivo, semissólido e biorreator RITA®, no início do período de experimentação e aos 7, 14, 21, 28, 35 e 42 dias de cultivo do clone de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*.

Figure 2 - Continuation. Pattern of shoots produced in culture medium with 2:1 ratio of $N-NO_3^- : N-NH_4^+$ in both cropping systems, solid and RITA® bioreactor at the beginning at the experiment and at 7, 14, 21, 28, 35 and 42 days of *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* clone cultivation.

Além da diferença no crescimento dos explantes, foi observada diferença no padrão de brotos produzidos entre os dois tipos de cultivo (semissólido e líquido). O sistema em meio semissólido formou tufo de multibrotações não-alongadas, enquanto o cultivo em biorreator produziu tufo com brotos alongados e bem definidos (Figura 2). O cultivo em meio semissólido apresentou

como padrão, brotações menores e taxa de multiplicação inferior comparativamente ao cultivo em imersão temporária, característica que pode estar relacionada com a pouca possibilidade de trocas gasosas no sistema tradicional (ETIENNE; BERTHOULY, 2002). Esse mesmo padrão de brotações também foi relatado por McAlister *et al.* (2005) em *Eucalyptus*.

CONCLUSÕES

O cultivo em meio líquido foi superior ao meio semissólido com relação à produção de matéria fresca e produtividade dos explantes, sendo essa superioridade melhor expressada para o período de 35 dias de cultivo.

A hiper-hidricidade foi um fator limitante para as plantas cultivadas em sistemas de biorreatores sem trocas gasosas forçadas, alcançando percentuais próximos a 100%, não sendo percebida esta desordem fisiológica nas plantas cultivadas em meio semissólido.

O sistema de cultivo em ágar formou tufo de multibrotações não-alongadas, enquanto o cultivo em biorreator produziu tufo com brotos alongados mais bem definidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AITKEN-CHRISTIE, J.; SINGH, A.P.; DAVIES, H. Multiplication of meristematic tissue: a new tissue culture system for radiata pine. In: HANOVER, J.W.; KEATHLEY, D.E. **Genetic manipulation of wood plants**. New York: Plenum, 1988. p.413-432.

ALVARD, M.; COTE, F.; TEISSON, C. Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht v.32, n.1, p.55-60, 1993.

ESCALONA, M.; LORENZO, J.C.; GONZALEZ, B.; DAQUINTA, M.; GONZALEZ, J.L.; DESJARDINS, Y.; BARROTO, C.G. Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in temporary immersion system. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v.18, p.743-748, 1999.

ETIENNE, H.; BERTHOULY, M. Temporary immersion system in plant micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 69, n.3, p.215-231, 2002.

ETIENNE, H.; DECHAMP, E.; BARRY-ETIENNE, D.; BERTRAND, B. Bioreactors in coffee micropropagation. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Campos dos Goytacazes, v.18, n.1, p.45-54, 2006.

ETIENNE, H.; LARTAUD, M.; MICHAUX-FERRIÉRE, N.; CARRON, M.P.; BERTHOULY, M.; TEISSON, C. Improvement of somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis* using the temporary immersion technique. **In vitro Cellular and Developmental Biology Plant**, Raleigh, v.33, p.81-87, 1997.

GASPAR, T.; KEVERS, C.; DEBERGH, P.; MAENE, L.; PAQUES, M.; BOXUS, P. Vitrification: morphological, physiological and ecological aspects. In: BONGA, J.M.; DURZAN, D.J. (Eds.). **Cell and tissue culture in forestry**. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, 1987. v.1, p.152-166.

GUPTA, P.K.; TIMMIS, R. Mass propagation of conifer trees in liquid cultures-progress towards commercialization. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.81, n.3, p.339-346, 2005.

HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E.; DAVIES JUNIOR, F.T. GENEVE, R.L. **Plant propagation: principles and practices**. 7.ed. New Jersey: Prentice-Hall, 2002. 880p.

LEMONS, 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, p.482-487, 2001.

LORENZO, J.C.; GONZALEZ, B.L.; ESCALONA, M.; TEISSON, C.; ESPINOSA, P.; BARROTO, C. Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 54, n.3, p.197-200, 1998.

McALISTER, B.; FINNIE, J.; WATT, M.P.; BLAKEWAY, F. Use of the temporary immersion bioreactor system (RITA) for production of commercial *Eucalyptus* clones in Mondi Forest (SA). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.81, n.3, p.347-358, 2005.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and Bio Assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Kopenhagen, v.15, n.3, p.473-497, 1962.

NIEMENAK, N.; SAARE-SURMINSKI, K.; ROHSIUS, C.; NDOUMOU, D. O.; LIEBEREI, R. Regeneration of somatic embryos in *Theobroma cacao* L. in temporary immersion bioreactor and analyses of free amino acids in different tissues. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 27, n.4, p.667-676, 2008.

REIS, J.P.; MORAIS, P.B.; PENCHEL, R.; HENRIQUE, A. Micropropagação de eucalipto no sistema de imersão temporária. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 1., 2003, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLAm 2003. p.276.

- 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.
- SILVA, A.B.; PASQUAL, M.; TEIXEIRA, J.B.; ARAÚJO, A.G. Métodos de propagação do abacaxizeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.42, n.9, p.1257-1260, 2007.
- TAKAYAMA, S.; AKITA, M. Bioengineering aspects of bioreactor application in plant propagation. In: GUPTA, S.D.; IBARAKI, Y. **Plant tissue culture engineering**. Dordrecht: Springer, 2005. p.83-100.
- TAKAYAMA, S.; AKITA, M. The types of biorreactor used for shoot and embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.39, n.2, p.147-156, 1994.
- TEISSON, C.; ALVARD, D. *In vitro* production of potato microtubers in liquid medium using temporary immersion. **Potato Research**, Dordrecht, v.42, n.3-4, p.499-504, 1999.
- WHITEHOUSE, A.B.; MARKS, T.R.; EDWARDS, G.A. Control of hyperhydricity in *Eucalyptus axillary* shoot cultures grown in liquid medium. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.71, n.3, p.245-252, 2002.

Recebido em 22/07/2010

Aceito para publicação em 11/08/2011

