

RADJISKUMAR MOHAN

**PROPAGAÇÃO VEGETATIVA *IN VITRO*: USO DO BAGAÇO  
DE CANA-DE-AÇÚCAR COMO MATERIAL SUPORTE  
ALTERNATIVO DE BAIXO CUSTO NA FASE DE  
ENRAIZAMENTO DE MARUBAKAIDO  
(*Malus prunifolia*).**

Dissertação apresentada como requisito  
parcial à obtenção do título de Mestre.  
Curso de Pós-Graduação em Tecnologia  
Química, Setor de Tecnologia da  
Universidade Federal do Paraná.

Orientador:  
Prof. Dr. Carlos R. Soccol

Co-orientadora:  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marguerite Quoirin

CURITIBA

2001

Mohan, Radjiskumar

Propagação vegetativa in vitro: uso do bagaço de cana-de-açúcar como material de suporte alternativo de baixo custo na fase de enraizamento de marubakaido (*Malus prunifolia*) / Radjiskumar Mohan. — Curitiba, 2001.

x, 62 f. : il., grafs.

Orientador: Carlos Ricardo Soccol, Marguerite Quoirin  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia.

1. Plantas – Propagação. 2. Bagaço de cana – Reaproveitamento.  
I. Soccol, Carlos Ricardo. II. Quoirin, Marguerite. III. Título.

CDD 20. 628.4458

**RADJISKUMAR MOHAN**

**PROPAGAÇÃO VEGETATIVA *IN VITRO*: USO DO BAGAÇO DE  
CANA-DE-AÇÚCAR COMO MATERIAL SUPORTE ALTERNATIVO  
DE BAIXO CUSTO NA FASE DE ENRAIZAMENTO (*Malus  
prunifolia* Borkh)**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Tecnologia Química – com concentração em Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:

Orientador:



Prof. Dr. CARLOS RICARDO SOCCOL  
Setor de Tecnologia, UFPR



Prof. Dr.ª GIZELLA MARIA ZANIN  
Departamento de Engenharia Química, UEM



Prof. Dr.ª IDA CHAPAVAL PIMENTEL  
Setor de Ciências Biológicas, UFPR

Curitiba, 05 de Dezembro de 2001

À minha avó Ramradjie Boedhan Mohan,  
pela minha educação.

Aos meus pais Swamipersad Mohan e  
Radjpatie Mathoera, pelo apoio no decorrer  
deste trabalho.

À minha namorada Mariam Pereira de  
Carlos, pela compreensão da minha  
ausência durante a realização deste trabalho.



## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Carlos Ricardo Soccol, pela orientação durante a realização deste estudo, mostrando a verdadeira importância da pesquisa científica inovadora.

À Prof<sup>a</sup>. Marguerite Quoirin, pela co-orientação e o espaço cedido no seu laboratório de pesquisas.

À coordenação do Curso de Tecnologia Química pela compreensão e auxílio prestado.

À coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos - PPGTA, Prof<sup>a</sup>. Nina Waszczynskyj.

Aos meus pais, agradeço especialmente o apoio irrestrito, o incentivo constante, nesta longa jornada pelos bancos da escola.

Às mulheres da minha vida (Radjpatie Mathoera, Anoeradha Mohan e Mariam Pereira de Carlos Dextre) pela presença serena, ajuda infinita e felicidade transmitida em momentos difíceis.

Aos meus grandes amigos, Eng<sup>o</sup>. Químico Marcos Vinicius, Prof. Oscar von Meien, Prof. Moacir Kaminski, Prof. Juarez de Soares, Eng<sup>o</sup>. Arley Silva, Prof<sup>a</sup>. Maria Lucia Masson e Prof. Paulo S.G. Fontoura.

À minha estagiária de iniciação científico, Gisele Okamoto pelo ajuda e realização dos experimentos.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	vii
LISTA DE TABELAS .....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	ix
Resumo .....	1
Abstract .....	3
1. HISTÓRICO .....	5
2. INTRODUÇÃO .....	7
2.1 Revisão Bibliográfica .....	9
2.1.2 Cana-de-açúcar- Característica da cultura .....	10
2.1.3 Aspectos Econômicos e Distribuição da Produção .....	10
2.1.4 Processamento e Principais Produtos .....	10
2.1.5 Composição Química.....	11
2.2 Micropropagação.....	12
2.2.1 Vantagens da Micropropagação .....	12
2.2.2 Meios de Cultura .....	13
2.2.3 Benziladenina (BAP ou BA).....	15
2.2.4 Ácido 3-Indolbutírico (IBA) .....	15
2.3 Agentes Gelificantes.....	16
2.3.1 Ágar .....	16
2.3.2 Efeitos Físicos de Géis de Ágar .....	17
2.3.3 Gelrite .....	17
2.4 Enraizamento .....	18
2.4.1 As Desvantagens do Enraizamento <i>in vitro</i> .....	20
2.4.2 Fases do Enraizamento .....	21
2.4.3 Indução de Raízes.....	21
2.4.4 Fatores Dependentes do Tecido .....	22

2.4.4.1 Tamanho da Microestaca .....	22
2.4.4.2 Juvenilidade.....	22
2.5 Suportes .....	22
2.5.1 Materiais porosos .....	23
2.5.2 Granulometria do substrato.....	23
2.5.3 Umidade.....	24
2.5.4 Tensão de Oxigênio .....	24
2.5.5 Concentração de Gás Carbônico .....	24
2.6 Suportes Alternativos .....	25
2.7 Macieira ( <i>Malus</i> ).....	25
2.7.1 Aspecto Econômico.....	25
2.7.2 Características da Cultivar do Porta-Enxerto <i>Marubakaido</i> .....	26
3.0 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1 Meio de Cultura para Multiplicação.....	27
3.2 Meio de Cultura para o Enraizamento.....	28
3.2.1 Meio de Cultura Líquido.....	28
3.2.2 Meio de Cultura Sólido.....	28
3.3. Substrato de enraizamento.....	29
3.3.1 Preparo do Substrato.....	29
3.3.2 Preparo das Microestacas.....	32
3.4 Testes.....	32
3.4.1 Pré-testes com Substrato.....	32
3.4.2 Testes com o Substrato .....	33
3.4.3 Testes com Meio de Cultura Comercial .....	33
3.5 Aspecto das Microestacas e do Meio de Cultura .....	33
3.6 Estudo Econômico.....	34
3.7 Análise Estatística .....	34

3.8 Fluxograma do Preparo do Suporte Alternativo .....	34
3.9 Fluxograma dos Testes Comparativos.....	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	37
4.1 Efeito da Granulometria do Bagaço de Cana-de-Açúcar no Processo de Enraizamento de Microestacas de Macieira .....	37
4.2. Avaliação da Resposta dos Estudos de Enraizamento em Suporte a Base de Bagaço de Cana-de-Açúcar em Comparação com o Suporte Tradicional a Base de Ágar.....	38
4.3 Fisiologia .....	44
4.4 Estudo Econômico Comparativo entre os dois Meios de Enraizamento.....	49
5. CONCLUSÕES .....	52
6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	55
ANEXO I.....	62

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: PLANTAÇÃO DE CANA-DE-AÇÚCAR NO BRASIL.....	9
FIGURA 2: ESTRUTURA MOLECULAR DA BENZILADENINA (BA).....	15
FIGURA 3: ESTRUTURA MOLECULAR DO ÁCIDO INDOLBUTÍRICO (IBA).....	16
FIGURA 4: PROCESSO DE ENRAIZAMENTO <i>IN VITRO</i> PARA <i>EX VITRO</i> (Fonte: GEORGE, 1993a).....	20
FIGURA 5: VISTA MACROSCÓPICA DE UMA SEÇÃO DE UM COLMO DE CANA-DE-AÇÚCAR. AS CÉLULAS ARMAZENADORAS DE AÇÚCAR (PARÊNQUIMA) SÃO CHAMADAS DE MEDULA (Fonte: MARTIN, 1961).....	30
FIGURA 6: MATERIAL SELECIONADO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR ANTES DE SER PROCESSADO.....	31
FIGURA 7: FRAGMENTADOR DO TIPO FACA MARTELO USADO PARA TRITURAR O BAGAÇO EM PARTÍCULAS MENORES (A), (B); LÍQUIDIFICADOR INDUSTRIAL USADO PARA REFINAR AS PARTÍCULAS MENORES (C).....	31
FIGURA 8: FLUXOGRAMA DE COLETA E PROCESSAMENTO DO SUPORTE ALTERNATIVO (BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR) PARA MEIO DE CULTUR.....	35
FIGURA 9: FLUXOGRAMA DOS TESTES REALIZADOS COM SUPORTE ALTERNATIVO (BAGAÇO DE CANA-DE AÇÚCAR) E MEIO DE CULTURA CONVENCIONAL CONTENDO AGAR.....	36
FIGURA 10: EVOLUÇÃO DO CRESCIMENTO E DE ENRAIZAMENTO DAS MICROESTACAS DE MARUBAKAIDO FORMADOS NOS DOIS SUPORTES ÁGAR (A) E BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR (B)- (GRANULOMETRIA < 0,177mm) DURANTE O PERÍODO DE 38 DIAS.....	45
FIGURA 11: ENRAIZAMENTO DAS MICROESTACAS DE MARUBAKAIDO OBTIDO NO MEIO de cultura COM ÁGAR (A) E NO MEIO DE CULTURA COM BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR FINO (B) APÓS 48 DIAS.....	46
FIGURA 12: COMPARAÇÃO DAS PLÂNTULAS ENRAIZADAS NO MEIO DE CULTURA COM ÁGAR (A) E NO MEIO DE CULTURA COM BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR FINO (B) APÓS 38 DIAS <i>IN VITRO</i> .....	47
FIGURA 13: COMPARAÇÃO DAS PLÂNTULAS ENRAIZADAS NO MEIO COM ÁGAR (A) E NO MEIO ALTERNATIVO, BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR FINO (B), APÓS 48 DIAS <i>IN VITRO</i> .....	47
FIGURA 14: ILUSTRAÇÃO DAS RAÍZES OBTIDAS NO MEIO DE CULTURA COM ÁGAR (A) E NO MEIO DE CULTURA COM BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR FINO (B), APÓS 42 DIAS.....	48

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - EFEITO DA GRANULOMETRIA DO BAGAÇO DE CANA SOBRE O ENRAIZAMENTO DE MICROESTACAS DE MACIEIRA ( <i>Malus prunifolia</i> Borkh).....	37
TABELA 2 - COMPARAÇÃO ENTRE MEIO DE CULTURA SOLIDIFICADO COM ÁGAR E SUPORTE ALTERNATIVO DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR (Granulometria < 0,177 mm) QUANTO AO NÚMERO DE RAÍZES EM MICROESTACAS DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO.....	40
TABELA 3 - COMPARAÇÃO ENTRE MEIO DE CULTURA SOLIDIFICADO COM ÁGAR E SUPORTE ALTERNATIVO A BASE DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR (Granulometria < 0,177 mm) QUANTO AO COMPRIMENTO DAS RAÍZES EM MICROESTACAS DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO.....	42
TABELA 4 - EFEITO COMPARATIVO DO MEIO SOLIDIFICADO COM ÁGAR E SUPORTE ALTERNATIVO A BASE DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR (Granulometria < 0,177mm) SOBRE O COMPRIMENTO CAULINAR DAS MICROESTACAS DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO.....	43
TABELA 5 - PLANILHA DE CÁLCULO DOS CUSTOS DO MEIO DE CULTURA A BASE DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR PARA 1000 PLANTAS .....	49
TABELA 6 - PLANILHA DE CÁLCULO DOS CUSTOS DO MEIO DE CULTURA A BASE DE ÁGAR PARA 1000 PLANTAS.....	50

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Altern.	ALTERNATIVO
Cresc.	CRESCIMENTO
CV	COEFICIENTE DE VARIAÇÃO
SEAB	SECRETARIA DE AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO
Ton.	TONELADA

### Formulas Químicas

$\text{NH}_4\text{NO}_3$	NITRATO DE AMÔNIA
$\text{KNO}_3$	NITRATO DE POTÁSSIO
$\text{H}_3\text{BO}_3$	ÁCIDO BÓRICO
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	FOSFATO DE POTÁSSIO MONOBÁSICO
KI	IODETO DE POTÁSSIO
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	MOLIBDATO DE SÓDIO DI-HIDRATADO
$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	CLORETO DE COBALTO HEXA-HIDRATADO
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	CLORETO DE CÁLCIO DI-HIDRATADO
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	SULFATO DE MAGNÉSIO HEPTA-HIDRATADO
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	SULFATO DE MANGANÊS TETRA-HIDRATADO
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	SULFATO DE ZINCO HEPTA-HIDRATADO
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	SULFATO DE COBRE PENTA-HIDRATADO
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	SULFATO DE FERRO II HEPTA-HIDRATADO
$\text{Na}_2\text{EDTA}$	ETILENO DIAMINO TETRA ACETATO DE SÓDIO
$\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_2$	ÁCIDO NICOTÍNICO

$C_{12}H_{17}ClN_4OS \cdot HCl$	TIAMINA.HCL
$C_8H_{11}NO_3 \cdot HCl$	PIRIDOXINA.HCL
$C_2H_5NO_2$	GLICINA
$C_6H_{12}O_6$	MIO-INOSITOL
$C_6H_{12}O_5$	SACAROSE



## Resumo

PROPAGAÇÃO VEGETATIVA *IN VITRO* : USO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR COMO MATERIAL DE SUPORTE ALTERNATIVO DE BAIXO CUSTO NA FASE DE ENRAIZAMENTO.

A agroindústria açucareira é uma das mais importantes do mundo, sendo o Brasil o maior produtor mundial de açúcar de cana. Esse tipo de agroindústria gera vários subprodutos como bagaço, torta dos filtros e melaço. O aproveitamento racional desses subprodutos é de extrema importância ao setor produtivo brasileiro.

Este trabalho tem por objetivo reduzir os custos e melhorar a qualidade dos produtos obtidos pela técnica de micropropagação vegetal, uma vez que esta técnica tem grande importância por permitir a clonagem de plantas selecionadas. Importante melhoria no processo de enraizamento com redução nos custos foi conseguida na fase de enraizamento através da utilização do suporte natural a base de bagaço de cana-de-açúcar em substituição ao ágar (composto gelificante) nos meios de cultivo (Patente INPI: SOCCOL *et al.*, 2001. Os ensaios foram realizados utilizando sais de Murashige & Skoog (1962) metade da concentração, sacarose 3%, ácido indolbutírico e porta-enxerto de macieira Marubakaido (*Malus prunifolia* Borkh). O meio de cultura líquido foi preparado sem a adição do composto gelificante (ágar) e misturado ao suporte (bagaço de cana-de-açúcar previamente tratado em autoclave a 121°C e 1,05 kgf/cm<sup>2</sup> durante 20 minutos) em frasco de cultura (vidro) de 200 mL. As microestacas de macieira foram transferidas a esses meios de cultura e os vidros colocados em câmara de crescimento a 26 ± 5 °C sob luz fotoperiódico –16hrs, fluorescente branca com densidade de fótons de 40 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>.

Foram avaliados o número e o comprimento das raízes, assim como a altura de cada planta (parte aérea) em diferentes tempos (12, 18, 28 e 38 dias de cultura) em 8 plantas independentes, bem como a evolução do teor de umidade do substrato no período.

Comparando os resultados obtidos com o meio comercial (contendo ágar), observou-se que no meio contendo bagaço de cana-de-açúcar obteve-se um desempenho superior da ordem de 22% para o comprimento da raiz, 20% para a altura da planta e 63% em relação ao número de raízes formadas. Este trabalho permitiu demonstrar que o bagaço de cana-de-açúcar possui grande potencial para ser utilizado como substituto do ágar, com diversas vantagens, no processo de enraizamento em técnicas de micropropagação vegetal.

## Abstract

### *IN VITRO* VEGETATIVE PROPAGATION: USE OF SUGAR-CANE BAGASSE AS AN ALTERNATIVE LOW COST SUPPORT MATERIAL ROOTING.

The sugar agro-industry is one of the most important in the world, being Brazil the largest sugarcane producer. This industry generates a large variety of by-products like bagasse, filter residues and sugarcane syrup. A rational utilization of these by-products is extremely important for the Brazilian productive sector.

The purpose of this work was to reduce costs and to improve the quality of plant material during micropropagation, once this technique is very important, since it permits the cloning of selected plants. Important improvement of the rooting process, coupled with cost reduction, was obtained during *in vitro* rooting by the use of a natural support based on sugar cane bagasse as a substitute for the traditionally used ágar (gelling agent) in the rooting medium (Patent INPI: SOCCOL *et al.*, 2001). The tests were done with micro-cuttings of Marubakaido (*Malus prunifolia* Borkh) in rooting medium (salts at half the concentration of Murashige & Skoog, 1962, sucrose 3 % and 0,5 µM indol-butyric acid).

The liquid medium was prepared without the addition of the gelling agent (ágar) in an culture flask (200 ml) and autoclaved together with pre-treated sugarcane bagasse in culture flasks, at 121 °C and 1,05 kgf/cm<sup>2</sup>, during 20 minutes. The liquid cultivation medium was added to the culture flasks containing the bagasse under sterile conditions. The apple rootstocks were transferred to the flasks and kept in a growing room at 26 ± 5 °C under white fluorescent periodical light-16 hrs, with a flux density of photons of 40 µmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>.

The root number and length and the height of each plant (shoots) were recorded after 12, 18, 28 and 38 days of culture in 8 different plants. The substrate relative humidity was also recorded. A comparison of the results found for the agar-grown and bagasse-grown micro-cuttings, showed that the sugarcane bagasse yielded better results such a 22 % increase

on root length, 20 % increase on plant height and also a 63 % increase on the number of roots compared to the agar-grown micro-cuttings.

These results demonstrate that the sugarcane residues can be used as a substitute for the agar, with innumerable advantages, during the rooting stage in plant micropropagation techniques.

## 1. HISTÓRICO

No início do século XX, a genética transformou-se, rapidamente, em uma área fundamental ao conhecimento da biologia dos organismos vivos. Desde então, a aplicação dos princípios genéticos para a obtenção de plantas com desempenho agrícola superior tem sido sistemático, por meio da utilização dos mais diversos métodos. Da mesma forma, paralelamente, verificou-se um progresso considerável nas técnicas de cultivo *in vitro* de células e tecidos de plantas (FERREIRA *et al.*, 1998).

A capacidade dos tecidos vegetais cultivados *in vitro* em formar gemas, raízes ou embriões somáticos vem despertando a atenção de pesquisadores, devido a sua grande aplicação prática e importância para o avanço dos conhecimentos nas áreas de Fisiologia, Bioquímica e Genética de plantas (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

A propagação vegetativa *in vitro*, também denominada micropropagação por causa do tamanho dos propágulos utilizados, é a aplicação mais prática da cultura de tecidos e aquela de maior impacto (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

A utilização da micropropagação em âmbito comercial é realidade em diversos países do mundo desde os anos 80, com destaque para os da Europa Ocidental e Estados Unidos. Os laboratórios comerciais surgiram, em grande maioria, agregados aos viveiros como iniciativa das próprias companhias produtoras de mudas. Eles trabalham com o objetivo de satisfazer as necessidades internas de material de propagação livre de doenças, ou para acelerar os métodos convencionais de propagação vegetativa. O Brasil, onde a aplicação comercial da micropropagação é relativamente recente, conta com diversos grupos trabalhando em instituições públicas de pesquisa e universidades, entretanto são poucas as empresas que trabalham na área (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

O melhoramento genético de culturas é conseguido com a simples aplicação da técnica de cultura de tecidos vegetais de plantas como café, cenoura, macieira, fumo, plantas medicinais, etc., seguida de uma bateria de técnicas de manuseio e micropropagação, gerando, assim, embriões da mesma espécie vegetal em condições adequadas.

## 2. INTRODUÇÃO

Praticamente todos os produtos de natureza orgânica (produtos ou subprodutos da agricultura ou do processamento de vegetais), podem servir como substrato nos processos fermentativos (SOCCOL *et al* 1995a, 1996, 1998 e REGULY, 1998). A literatura é vasta em processos fermentativos para obtenção de produtos através do metabolismo de bactérias, fungos e leveduras utilizando como substratos os resíduos agro-industriais.

Em geral, as culturas agrícolas produzem volumes importantes de resíduos e subprodutos, os quais são muito pouco utilizados, ou quando são, utiliza-se apenas para produção de calor pela sua queima. Apenas 5% da produção agrícola de café é utilizado como bebida, os 95% restantes são constituídos de palhas, cascas, fibras, borra e folhas que se transformam em subprodutos ou resíduos agro-industriais. Dentre os possíveis usos desses resíduos, destacam-se a sua biotransformação para obtenção de enzimas, alimentos, pigmentos, aromas, ácidos orgânicos, solventes orgânicos, hormônios vegetais, bioinsecticidas, etc. (SOCCOL, 2000).

Nos processos de produção de álcool, açúcar e outros derivados da cana-de-açúcar são gerados grandes volumes de resíduos. O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar e seus mais diretos derivados, representados pelos produtos: açúcar e álcool. O bagaço da cana-de-açúcar é descartado, podendo ser utilizado na geração de energia por meio de incineração, adubo na produção agrícola, matéria prima para produção de celulose e polpas, etc.. Para cada 100 kg de cana-de-açúcar, o bagaço representa aproximadamente 27 a 30 kg nos processos de extração do caldo. Na maioria das vezes este resíduo não é aproveitado, sendo deixado em pilhas perto das fazendas, causando um grande problema ambiental. O bagaço, do ponto de vista físico, é constituído por quatro frações: fibra ou bagaço, sólidos insolúveis, sólidos solúveis e água com 45 %, 2-3 %, 2-3 % e 50 % respectivamente

(ICIDCA-GEPLACEA-PNUD, Cuba - 1990). No caso específico do bagaço de cana-de-açúcar, ao invés do mesmo ser utilizado apenas como combustível na geração de energia, busca-se alternativas para a sua utilização como substrato ou suporte em diferentes processos biotecnológicos. Uma dessas alternativas seria a sua utilização como suporte em processos de micropropagação e enraizamento de tecidos vegetais.

Os objetivos deste trabalho foram buscar uma técnica para reduzir os custos da técnica de micropropagação de plantas pela utilização de resíduos e sub-produtos agrícolas e agro-industriais e elaborar cálculos de viabilidade e produtividade das plantas obtidas.



## 2.1 Revisão Bibliográfica

### 2.1.2 Cana-de-açúcar- Característica da cultura

A cana de açúcar, *Saccharum officinale*, é uma das gramíneas mais cultivadas nas regiões tropicais e subtropicais devido à enorme contribuição sócio-econômica que representa a sua exploração, em razão de sintetizar e armazenar concentrações expressivas de sacarose. A cana-de-açúcar é utilizada como matéria-prima básica na produção de três importantes produtos agro-industriais: açúcar, aguardente e álcool (PARANHOS, 1987).

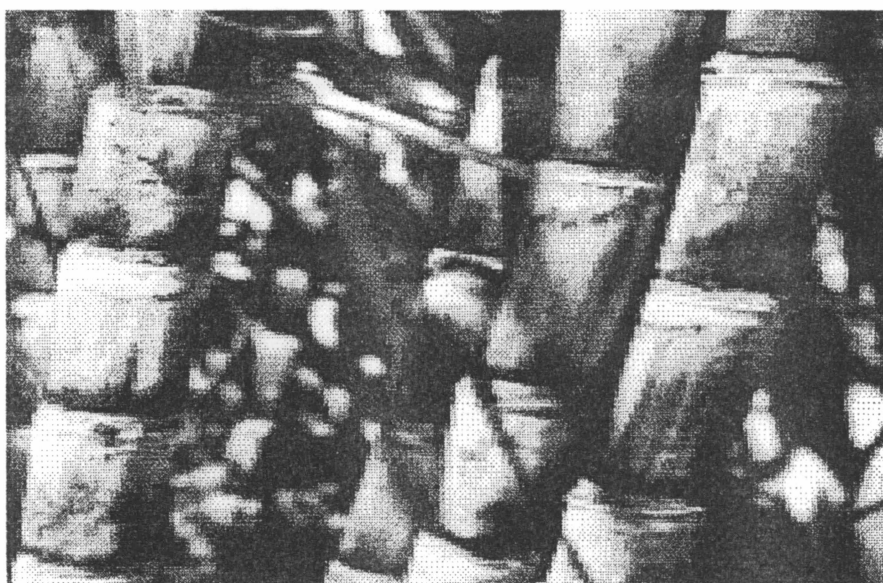


FIGURA 1: PLANTAÇÃO DE CANA-DE-AÇÚCAR NO BRASIL

### 2.1.3 Aspectos Econômicos e Distribuição da Produção

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar como ilustrado na figura 1 e de seus mais diretos derivados, representados pelos produtos açúcar e álcool. O Brasil lidera também em produtividade agrícola com 72,6 t/ha, seguido de perto pela China com 71,3 t/ha e Índia com 66,9 t/ha, enquanto a média mundial é de 61,9 t/ha. A produção da matéria-prima mundial a partir de 1999, no Brasil foi de 338,0 milhões de toneladas ou 27 %, a Índia com

265,0 milhões ou 21%, China com 85,6 milhões ou 7 %, Cuba com 40 milhões de toneladas ou 3%, respondendo por 60% da oferta de cana-de-açúcar no mundo. O Brasil expandiu a sua produção em 77,7 %, tornando-se o maior exportador de açúcar de cana do mundo (SEAB *Informe ao Secretário - Cana de açúcar*, 1999).

O Paraná é o 3º produtor nacional de cana-de-açúcar. O setor sucroalcooleiro do Brasil é altamente competitivo na área econômica e social. Sob o enfoque da renda bruta gerada, a cana-de-açúcar deverá amealhar o correspondente a R\$ 5,39 bilhões, em 1999, ou 8,3 % da renda agrícola total. Situa-se em 2º lugar no contexto agrícola e em 3º, no contexto agropecuário, atrás da soja e da carne bovina, respectivamente, com 11,4 % e 18,8 %. Por sua vez, os empregos gerados pelo setor são estimados em 1 milhão de pessoas no Brasil (SEAB *Informe ao Secretário - Cana de açúcar*, 1999).

O ciclo de cana-de-açúcar no Brasil é anual, em um curso de 12 a 14 meses, incluídas as fases de crescimento e maturação. Também existem casos de dois ciclos, com o propósito de obter uma maior massa de cana e de açúcar por hectare (LEME JÚNIOR e BORGES, 1965).

#### **2.1.4 Processamento e Principais Produtos**

A tecnologia usada para extração do caldo consiste em moendas. Antes disso, a cana-de-açúcar passa por três fases: facas, desfibradores e esmagadores. Estas fases são chamadas de preparação da cana de açúcar. As moendas são constituídas por rolos pesados que rompem, por compressão, as células da cana, extraíndo a maior parte do caldo (LEME JÚNIOR e BORGES, 1965).

O bagaço de cana-de-açúcar é descartado e pode ter finalidades diferentes como: matéria-prima para geração de energia por meio da incineração, material de adubação no

próprio campo de produção, matéria-prima para produção de celulose e polpas e outros. Para uma quantidade de 100 % de cana-de-açúcar, 27 a 30 % é gerado como bagaço de cana nos processos de extração do caldo (ICIDCA-GEPLACEA-PNUD, Cuba -1990).

### **2.1.5 Composição Química**

A composição química da cana-de-açúcar é muito variável, em função das condições climáticas, das propriedades físicas, químicas e microbiológicas do solo, do tipo de cultivo, da variedade, do estágio de maturação e da idade, bem como de muitos outros fatores. Da sua composição, 99% são devidos aos elementos hidrogênio, oxigênio e carbono, sendo o restante devido a outros elementos. A distribuição destes elementos no colmo, em média, é de 74,5% em água; 25% de matéria orgânica e 0,5% em matéria mineral, com a ressalva de que estes constituintes não se encontram nas mesmas proporções nas diferentes partes do colmo (PARANHOS, 1987).

Nos últimos anos, houve nas indústrias açucareiras uma tendência a aumentar o grau de preparação da cana com o objetivo de extrair maior quantidade de açúcar, o que favorece as indústrias consumidoras de bagaço. Este é composto, do ponto de vista físico, por: fibra (fração sólida orgânica insolúvel em água presente no talo da cana), 45%; sólidos insolúveis, 2 a 3%; sólidos solúveis, 2 a 3% e água, 50%. Quimicamente, é composto por: celulose, hemicelulose e lignina, principais polímeros naturais e pequenas quantidades de outros compostos classificados como componentes estranhos (ICIDCA-GEPLACEA-PNUD, Cuba - 1990).

## **2.2 Micropropagação**

A micropropagação de plantas se refere a técnicas de clonagem realizadas *in vitro*. A maioria dos protocolos comerciais de micropropagação utiliza a presença de meristemas apicais e/ou axilares da planta-mãe, os quais são induzidos a se multiplicarem pela aplicação de citocininas nos meios de cultura. Em seguida, os brotos obtidos são enraizados mediante o uso de auxinas e transferidos à casa de vegetação (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

### **2.2.1 Vantagens da Micropropagação**

A aplicação dos métodos de micropropagação apresenta grandes vantagens sobre os métodos tradicionais de propagação vegetativa, particularmente para espécies tropicais que produzem níveis elevados de fenóis e taninos que podem inibir o enraizamento e a enxertia. Estes métodos encurtam o tempo requerido para o melhoramento, uma vez que permitem clonar alguns indivíduos selecionados em grande quantidade. De outro lado, a heterozigose das populações clonadas é conservada durante a micropropagação. Igualmente pode ser útil aplicar a micropropagação para estabelecer pomares para a produção de sementes ou para clonar linhas parentais em segregação para obter sementes de híbridos intervarietais (NORIEGA e SONDAHL, 1993). Outra vantagem destes métodos é que eles asseguram um rejuvenescimento do material vegetal (MICHAUX-FERRIÈRE *et al.*, 1989).

Segundo QUOIRIN (1996), as enormes vantagens oferecidas pela micropropagação indicam que essa técnica poderia finalmente substituir os métodos tradicionais utilizados em viveiros. Isso implica que os serviços e custos sejam reduzidos e as taxas de multiplicação das mudas sejam incrementadas substancialmente. Entre as características originais de uma planta

ideal podem ser citadas: resistência a doenças crônicas de campo como ferrugem e nematóides; adaptação ao ambiente de cultura da própria planta ou espécie (condições climáticas); produção de um maior número de frutos e de maior grandeza em termos de qualidade e quantidade; apenas um período de amadurecimento dos frutos, sem a geração de mão de obra extra. Essas propriedades expressas em uma planta, têm conseqüências positivas, tanto ao nível econômico como na qualidade do produto final.

### **2.2.2 Meios de Cultura**

Para manter as funções vitais de uma cultura, o meio básico constituído por sais inorgânicos, adaptados conforme a necessidade da espécie em estudo, deve ser enriquecido com componentes orgânicos (aminoácidos, vitaminas), fitohormônios (reguladores de crescimento), fontes de carbono e suportes (gelificantes) quando necessário (ENDRESS, 1994).

Os vários sais inorgânicos são chamados de macro e microelementos conforme suas concentrações. Os macroelementos, como enxofre (utilizado na síntese de proteínas), magnésio, potássio e cálcio (essenciais no metabolismo celular) e ainda nitrogênio e fósforo, são adicionados em concentrações superiores a 100 ppm. Os microelementos, como ferro, boro, cloro, manganês, molibdênio, cobre e zinco, são adicionados em concentrações inferiores a 100 ppm.

Os aminoácidos são adicionados para substituir ou aumentar as fontes de nitrogênio. Já vitaminas como tiamina, piridoxina, ácido nicotínico e também inositol são adicionados à maioria dos meios, pois em vários casos a produção de vitaminas pelas células vegetais não é suficiente (ENDRESS, 1994).

A quantidade de fitohormônios afeta o crescimento e desenvolvimento dos tecidos em

cultura. Em geral, maior concentração de auxinas e menor concentração de citocininas estimulam o crescimento e alongamento celular, caso contrário, a divisão celular é estimulada. No entanto, excesso de ácido giberélico, responsável pelo crescimento das plantas, e componentes fenólicos, ocultam esses fenômenos. O ácido abscísico, usado em concentrações inferiores, pode controlar o desenvolvimento e crescimento padrão e ainda desempenhar um papel específico nos primeiros estágios da embriogênese somática. Usado em concentrações maiores, o ácido abscísico pode reprimir o crescimento e estimular a dormência. O etileno é produzido pelas culturas de tecidos vegetais *in vitro* e, pelo que se sabe, não desempenha nenhuma função benéfica. O etileno pode reprimir o crescimento celular e acelerar a senescência (envelhecimento) em algumas culturas (ENDRESS, 1994).

Carbono, principalmente na forma de sacarose, é adicionado ao meio porque as culturas celulares, geralmente, não são capazes de produzir sua própria fonte de energia (ENDRESS, 1994).

Muitas vezes é preferível a utilização de meios semi-sólidos e sólidos. Em tais meios acrescenta-se, ainda, substâncias com elevado poder gelificante como é o caso do ágar. Tais substâncias são chamadas de suportes dos meios em técnicas de micropropagação.

Normalmente, as substâncias utilizadas no preparo dos meios de cultura não são de fácil acesso nem baratas. Por isso são importantes as tentativas de modificar tais suportes, o que pode contribuir para reduzir os custos da micropropagação e também melhorar a qualidade do tecido propagado.

O custo dos componentes dos meios de cultura de tecidos é de interesse tanto para laboratórios de pesquisa quanto para os de produção. De qualquer modo, crescimento de brotos apicais *in vitro* foram obtidos quando o meio era gelificado com uma mistura de amido de milho e Gelrite (LYDON *et al.*, 1993).

### 2.2.3 Benziladenina (BAP ou BA)

Benziladenina é uma citocinina usada para a promoção de brotos ou meristemas axilares e apicais. Desta maneira, induzem o crescimento de maior número de plântulas. Ela pode causar formas irregulares como engrossamento das folhas, quando usada em concentrações altas (SUTTER e LANGHANS, 1981a). A benziladenina é de uso comum em laboratórios de pesquisas devido ao seu baixo custo. Outras citocininas naturais são, geralmente, mais caras e pouco encontradas em laboratórios comerciais ( WILCOX *et al.*, 1978, 1981). Na figura 2 mostra-se a estrutura molecular da benziladenina.

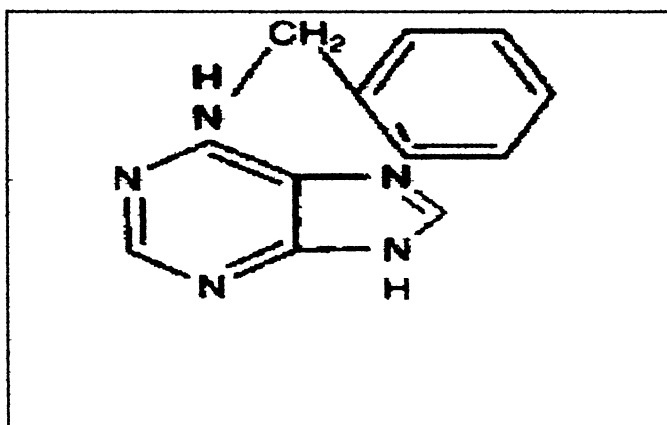


FIGURA 2: ESTRUTURA MOLECULAR DA BENZILADENINA (BA)

### 2.2.4 Ácido 3-Indolbutírico (IBA)

O IBA é uma auxina natural encontrada em plantas (PETER, 1995). Auxinas são capazes de iniciar o alongamento e crescimento celular e estão envolvidas na diferenciação de meristemas, originando tecidos e órgãos definidos. Em tecidos e órgãos, as auxinas são responsáveis pela manutenção da dominância apical. Uma outra auxina natural, mais comum, é o ácido 3 - indol acético (IAA). O IBA e IAA são usados quando a morfogênese é requerida

(CHATURVEDI *et al.*, 1978; SHARMA *et al.*, 1981a). Na figura 3 apresenta-se a estrutura molecular do IBA.

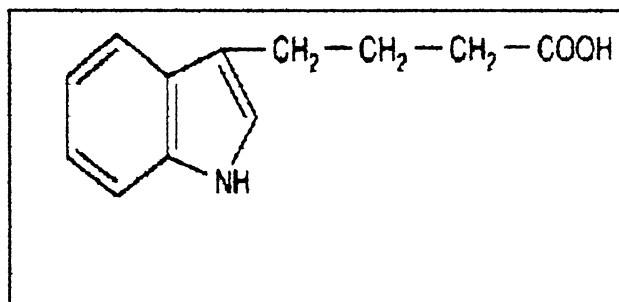


FIGURA 3: ESTRUTURA MOLECULAR DO ÁCIDO INDOLBUTÍRICO (IBA)

### 2.3 Agentes Gelificantes

Órgãos de plantas e de tecidos são suportados, de maneira mais adequada, na superfície dos meios de cultivo, pelo aumento da viscosidade do meio de cultivo por algum tipo de agente gelificante. Idealmente, o material escolhido para ser adicionado ao meio de cultura deve possibilitar sua esterilização por autoclavagem. Este meio deve ser líquido quando quente, mas viscoso quando resfriado. Diversos produtos estão disponíveis para gelificar meios de culturas para plantas, mas os resultados obtidos com cada um deles podem ser diferentes. A seleção do material mais adequado, em termos de taxa e custo de propagação, tem sido uma outra tarefa para a formulação de um protocolo apropriado para a propagação de cultura de tecidos de qualquer planta (GEORGE, 1993a).

#### 2.3.1 Ágar

O ágar tem sido, tradicionalmente, usado como agente gelificante para cultura de tecidos, e é largamente explorado para a preparação de meio de cultura semi-sólido. É usado por suas vantagens como o fato de formar um gel líquido com água a 100 °C e de solidificar a



uma temperatura cerca de 45 °C. Além disso, os géis não são digeridos pelas enzimas das plantas e o ágar não reage fortemente com os constituintes do meio. O ágar é composto por polissacarídeos complexos, constituído por galactose. O ágar é um produto natural extraído de espécies de algas vermelhas, as quais são seleccionadas a partir do mar em diversos países. Conforme a origem, o ágar pode ter sua composição diferenciada como produto final (GEORGE, 1993a).

É, usualmente, desnecessário o uso de ágar altamente purificado em trabalhos de micropropagação comerciais, uma vez que o alto custo trará desvantagens (BOXUS, 1978).

### **2.3.2 Efeitos Físicos de Géis de Ágar**

O crescimento de calos ou órgãos de plantas em meio solidificado é, geralmente, mais lento do que em meio de cultura líquido. Crescimento em géis duros é, consequentemente, inibido, mas a morfogênese pode ser melhorada quando a cultura de explantes ou de calos é mantida em meio suplementado com ágar (GEORGE, 1993a).

Um meio solidificado com ágar pode ter um potencial de água mais baixo (mais negativo) do que seu equivalente líquido (DEBERGH *et al.*, 1981) e isto pode ser responsável pelas respostas morfogênicas que, às vezes, ocorrem em ágar. A consistência de um meio aumenta linearmente com a concentração de ágar, e o contato entre explante e meio decresce, causando uma redução na absorção de reguladores de crescimento para o explante, íons minerais e substâncias orgânicas (DEBERGH, 1982).

### **2.3.3 Gelrite**

Gelrite é um agente gelificante alternativo, cujo uso está sendo cada vez mais freqüente. Gelrite é uma goma gelante, um hetero-polissacarídeo produzido pela bactéria

*Pseudomonas elodea*, o qual é composto por moléculas de K-glucuronato, raninose e celobiose (KANG *et al.*, 1982). Gelrite é uma alternativa atrativa ao ágar para cultura de tecidos, porque seu custo, por litro de meio, é baixo e produz um gel bem claro, o qual ajuda na observação de culturas e suas possíveis contaminações (GEORGE, 1993a).

## 2.4 Enraizamento

Plantas regeneradas pelas técnicas *in vitro*, embriogênese somática ou micropropagação, para resistirem ao ambiente normal, fora de vidros ou incubadoras, precisam estar em condições fisiológicas adequadas. Plantas bem enraizadas e saudáveis são as mais requeridas para estes casos. Culturas de plantas em ambientes isolados, *in vitro*, produzem plântulas frágeis que precisam ser aclimatizadas antes de serem transferidas para condições *ex vitro* (ambiente natural) para que construam a sua adaptação à atmosfera seca, temperatura flutuante e uma alta radiação solar (ALDERSON *et al.*, 1988). O processo normalmente seguido é representado na figura 4.

Certas estacas enraizam mais rapidamente, sobrevivem e/ou tem uma maior taxa de crescimento e produzem mais brotos laterais na fase de aclimatização, quando antes, têm sido enraizadas *in vitro*, e não *ex vitro* (TURNER *et al.*, 1987).

Como é difícil a obtenção de uma alta porcentagem de plântulas enraizadas e estabilizadas de certos porta-enxertos de macieira, uma grande parte da pesquisa ligada à micropropagação deste material, foi concentrada no processo de enraizamento. Brotos obtidos da fase de micropropagação, são sempre enraizados *in vitro*, porém podem ser enraizados em meios não esterilizados (GEORGE, 1993b). O meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) é empregado para enraizamento *in vitro*, porém com uma concentração menor das soluções salinas, por ex. ½ MS, o total de vitaminas MS, sacarose 30 g/L e IBA 0,1 mg/L (HUTCHINSON, 1985).

O IBA é, geralmente, conhecido como a auxina mais efetiva para a indução de raízes em *Malus*. A concentração mais eficiente de IBA varia com o genótipo (ALVAREZ *et al.*, 1989).

A promoção de raízes por auxinas sintéticas é auxiliada por compostos fenólicos, sendo o floroglucinol o promotor mais freqüente. Mesmo que o floroglucinol não estimule a proliferação de brotos na fase de micropropagação, pode aumentar a percentagem de iniciação e o número de plântulas enraizadas quando são impregnadas em um meio de enraizamento (JAMES e THURBON, 1981a,b).

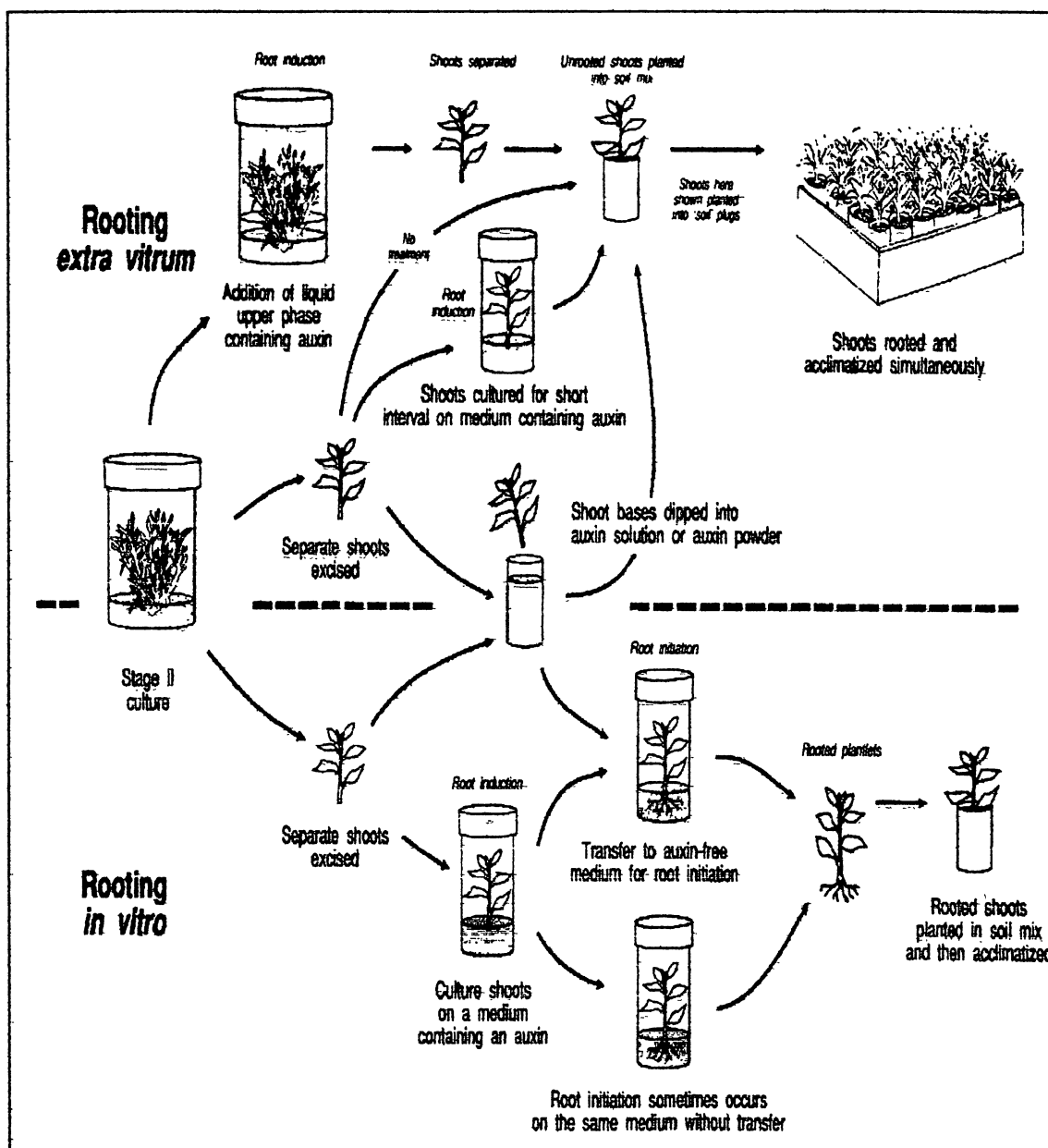


FIGURA 4: PROCESSO DE TRANSFERÊNCIA DO *IN VITRO* PARA *EX VITRO*  
(Fonte: GEORGE, 1993a)

#### 2.4.1 As Desvantagens do Enraizamento *in vitro*

A maior dificuldade consiste em produzir um sistema de enraizamento, o qual seja totalmente eficiente quando as plantas são transferidas para o solo. Raízes produzidas *in vitro*, freqüentemente, são finas, com falhas em conexões vasculares, e incapazes de desenvolver o câmbio secundário até que a planta seja transferida do recipiente. Raízes desenvolvidas *in vitro* são, provavelmente, danificadas quando as plântulas são removidas da cultura,

principalmente se houver necessidade de lavagem, antes de serem plantadas, para remoção de restos de ágar. Isto pode aumentar as chances de infecções com fungos e doenças bacteriológicas (DEBERGH e MAENE, 1981).

#### **2.4.2 Fases do Enraizamento**

Poucas plantas são apropriadas para desenvolver raízes em cachos de brotos, mas na maioria das espécies, os brotos são separados em microestacas para serem enraizados em meios apropriados. Vários fatores influenciam o sucesso de uma operação de enraizamento. Alguns são simples como o tamanho mínimo da planta; outros são mais complexos. Em geral podem ser distinguidas quatro fases no processo de enraizamento (MONCOUSIN, 1986): a fase de indução, quando a capacidade de formação da raiz é determinada; a fase de iniciação, quando as mudanças visíveis ocorrem; a fase de organização, quando o primórdio produzido pode ser observado no microscópio mediante cortes histológicas e a fase de crescimento (alongamento da raiz), quando o primórdio se desenvolve em raízes.

#### **2.4.3 Indução de Raízes**

A presença de auxinas é especialmente necessária para a indução de raízes, a qual acontece algumas horas após a sua aplicação (HAISSIG, 1986; COLLET, 1988). Em plantas e em situações onde auxinas exógenas são desnecessárias, existe um nível de auxinas endógenas presumivelmente adequado. A ferida causada durante o corte de uma plântula, libera ou causa concentração de compostos fenólicos, que provavelmente atuam como protetor de auxina. Aumentam, também, os níveis de IAA livre na base da plântula (MONCOUSIN, 1991). A atividade de peroxidases, baixa em tecidos expostos ao enraizamento, aumenta fortemente a iniciação da raiz (CHANDRA *et al.*, 1971; QUOIRIN *et*

*al.*, 1974). O enraizamento ocorre pelo fato de que a peroxidase tem a capacidade de oxidar o IAA endogênico no momento da indução ou antes dele, diminuindo gradativamente sua capacidade de atuação (MONCOUSIN e GASPAR, 1983; HAISSIG, 1986).

#### **2.4.4 Fatores Dependentes do Tecido**

##### **2.4.4.1 Tamanho da Microestaca**

Microestacas, às vezes, enraízam sozinhas desde que cheguem a um tamanho adequado. MACKAY e KITTO (1988) demonstraram que para se obter um maior enraizamento, os microcortes devem ser maiores que 10mm. As plantas obtidas a partir desses microestacas sobreviveram melhor e criaram mais raízes. Os melhores resultados de enraizamento com cultivares de rosas foram obtidos quando o tamanho mínimo da microestaca era de 2 cm (DOUGLAS *et al.*, 1989).

##### **2.4.4.2 Juvenilidade**

Como no caso de outras plantas lenhosas, microestacas de macieira produzidas a partir de subculturas, não enraízam bem. A capacidade de enraizar, usualmente, vai melhorando conforme aumenta o número das subculturas. Somente 8 % das microestacas enraizaram quando foi feito enraizamento a partir da cv 'Jonathan', mas depois de 9 subculturas a percentagem de microestacas enraizadas aumentou para 95 % (MULLINS *et al.*, 1986).

#### **2.5 Suportes**

Embora algumas culturas de plantas possam ser cultivadas em meios líquidos, para muitos outros fins é vantajoso suportar explantes, ou culturas, acima da superfície do meio.

Meio solidificado com ágar foi usado, primeiramente, para este objetivo por analogia a técnicas desenvolvidas em bacteriologia (GEORGE, 1993b). É melhor enraizar microestacas em substratos porosos irrigados com meio de cultivo, pois tem a vantagem de um bom enraizamento e as plântulas podem ser transferidas com pouca perturbação (HUTCHINSON *et al.*, 1984a; 1985b).

### **2.5.1 Materiais porosos**

Como é de se esperar, tecidos ou órgãos podem ser cultivados, além do papel, em outros materiais inertes e porosos. A aeração de tecidos e raízes pode aumentar em materiais (substratos) porosos sendo, usualmente, melhor que em meios sólidos de ágar ou em líquido estático. Isto porque há uma maior quantidade de oxigênio disponível no sistema poroso. Substratos já avaliados com sucesso para uso *in vitro* são: papel (papelão), areia grossa, vermiculita ou perlita, lã de rocha, etc., que absorvem o meio líquido, porém permitem a difusão livre de oxigênio (GEORGE, 1993b).

Microestacas de várias espécies crescem e enraízam satisfatoriamente em lã de rocha umedecida com meio líquido (TANAKA *et al.*, 1991). Vêlo de 100 % poliéster, em placa de petri, foi usado por CHENG e VOQUI (1977) com sucesso para suportar culturas, sendo irrigado pela parte superior com meio líquido.

### **2.5.2 Granulometria do substrato**

Geralmente, quando o substrato é de origem agro-industrial natural, o material pode ser pré-tratado, no melhor tamanho, na melhor forma de desempenho, mostrando uma alta eficiência para o crescimento microbiano com a finalidade de aumentar o rendimento do processo. Não se deve esquecer que existe um certo tamanho de partícula que tem o melhor

desempenho em cada processo (PANDEY *et al.*, 2001).

### **2.5.3 Umidade**

Umidade relativa (RH) é a medida da quantidade de vapor de água contido numa atmosfera gasosa. A umidade relativa da mistura gasosa (ar) acima do meio num frasco ou vidro, depende da temperatura do ar e do próprio meio. Quando a temperatura do ar se iguala à do meio, e o vidro ou frasco está bem fechado, a umidade relativa, teoricamente, será da ordem de 98 % - 99,5 %. Se considera que a umidade relativa, na maioria das culturas de tecidos vegetais, deve ficar na faixa de 99,25 a 99,75 % (GEORGE, 1993a).

### **2.5.4 Tensão de Oxigênio**

O oxigênio é necessário para a iniciação e o crescimento das raízes. Estudos realizados por SOFFER e BURGER (1988, 1989), com equipamentos específicos, mostraram que tanto o número quanto o tamanho das raízes produzidas em *Chrysanthemum* eram diretamente relacionados ao oxigênio dissolvido no meio. Não houve crescimento de raízes quando a taxa de oxigênio dissolvido era nula. Estes resultados são de grande importância para a indução de raízes em microestacas, particularmente, para aquelas que precisam ser enraizadas em meios com ágar, onde a difusão restrita pode causar menor pressão parcial de oxigênio do que em um sistema líquido agitado, ou em um material poroso molhado com o meio líquido (GEORGE, 1993a).

### **2.5.5 Concentração de Gás Carbônico**

A presença do gás carbônico em meios de cultura para enraizamento parece inibir a



indução e iniciação de raízes. Quando a concentração do CO<sub>2</sub> é menor que 350 µmol/ mol de ar, em certos meios de cultura, a percentagem de raízes por planta chega a diminuir (FOURNIOUX e BESSIS, 1993). Quando a concentração de CO<sub>2</sub> for de 1%, ele tem um efeito estimulador sobre o alongamento de plântulas e sobre o número de raízes (CHEETHAM *et al.*, 1992).

## **2.6 Suportes Alternativos**

A maioria dos laboratórios quer evitar o processo de lavagem das plantas retiradas de um meio com ágar, quando estas forem implantadas em meio de aclimatização, pelo fato de que este processo é demorado. Por isso se tem buscado outras alternativas para enraizar microestacas em meios líquidos, ou em substratos porosos. Melhores formações de raízes são obtidas em sistemas de meio líquido móvel ao invés de meios gelificados com ágar. Isto pode ser explicado pelo fato de que um sistema móvel tem mais oxigênio e menos CO<sub>2</sub> dissolvido (KUKREJA *et al.*, 1986). Infelizmente, quando microestacas são submersas em meios líquidos de enraizamento, uma alta proporção das plântulas transferida para meio *ex vitro* morre, uma vez que se tornam hiperhídricas. Isso aconteceu com microestacas de macieira do cultivar “Northern Spy” enraizadas em meio líquido (KROMER, 1987; HUTCHINSON, 1984a; 1985b).

## **2.7 Macieira (*Malus*)**

### **2.7.1 Aspecto Econômico**

Foi proposto a micropropagação de plantas de macieira como uma alternativa potencial de obtenção de plantas em substituição ao método tradicional de brotagem ou de

enxerto vigoroso com estacas (FAUST e FOGLE, 1980). A utilização de plantas deste tipo requer, primeiramente, um método efetivo e econômico para obtê-las. A micropropagação é o método mais lógico a ser utilizado. Esforços consideráveis estão sendo desenvolvidos para a produção de plantas usando técnicas *in vitro* (ZIMMERMAN, 1984a). A maioria das pesquisas relatadas sobre enraizamento de macieira foram realizadas em meios solidificados com ágar (JONES e HATFIELD, 1976; ZIMMERMAN e BROOME, 1980, 1981). A adaptação das plantas enraizadas *in vitro* em casa de vegetação ("aclimatização") requer que os brotos enraizados em ágar sejam manuseados cuidadosamente quando transferidos para o solo, evitando danos às raízes e secagem das folhas. O funcionamento dos estômatos é um ponto crítico para uma aclimatização bem sucedida (BRAINERD e FUCHIGAMI, 1981).

#### **2.7.2 Características da Cultivar do Porta-Enxerto *Marubakaido***

O porta-enxerto Marubakaido ( *Malus prunifolia* Borkh) apresenta boa resistência e adaptação em solos, o que vem despertando interesse em pesquisadores e produtores (OLIVEIRA e FORTES, 1996). O porta-enxerto Marubakaido, espécie de origem japonesa, é altamente resistente ao pulgão lanígero e à *Phytophthora*, mas muito sensível às viroses. Apresenta fácil enraizamento natural, porém quando o processo é realizado *in vitro* as raízes formadas são consideradas de baixa qualidade (ZANOL *et al.*, 1996).

## ❧ MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no período de setembro de 1999 a junho de 2001 no Laboratório de Processos Biotecnológicos (LPB II) do Departamento de Engenharia Química, Setor de Tecnologia, e no Laboratório de Micropropagação Vegetal do Departamento de Botânica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Os principais estudos executados foram:

- 1) Micropropagação do porta-enxerto de macieira (*Malus prunifolia*) Marubakaido.
- 2) Preparação de suporte alternativo a partir do bagaço de cana-de-açúcar.
- 3) Estudo do tamanho ideal da partícula do suporte (bagaço de cana-de-açúcar)
- 4) Observação do estado fisiológico e da morfologia das microestacas.
- 5) Grau de enraizamento das microestacas.
- 6) Estudo econômico para uso do suporte alternativo em processos de enraizamento

### 3.1 Meio de Cultura para Multiplicação

O meio de cultura para a etapa de multiplicação foi preparado com os sais MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), cuja composição é:  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  1650 mg/L;  $\text{KNO}_3$  1900 mg/L;  $\text{H}_3\text{BO}_3$  6,2 mg/L;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  170 mg/L; KI 0,83 mg/L;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  0,25 mg/L;  $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  0,025 mg/L;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  440 mg/L;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  370 mg/L;  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  22,30 mg/L;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  8,6 mg/L;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  0,025 mg/L;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  27,80 mg/L e  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  18,65 mg/L (marca MERCK). As vitaminas adicionadas ao MS foram: ácido nicotínico 0,5 mg/L; tiamina 0,1 mg/L; piridoxina HCl 0,5 mg/L; glicina 2,0 mg/L e inositol 100 mg/L. O fitohormônio foi o BA (benziladenina) 0,5 mg/L e a fonte de carbono sacarose 30 g/L. O pH foi ajustado para 5,8. Os frascos foram autoclavados por 20 minutos a 121 °C.

### **3.2 Meio de Cultura para o Enraizamento**

#### **3.2.1 Meio de Cultura Líquido**

O meio líquido da etapa de enraizamento foi preparado com a metade da concentração dos sais MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962):  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  825 mg/L;  $\text{KNO}_3$  850 mg/L;  $\text{H}_3\text{BO}_3$  3,1 mg/L;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  85 mg/L; KI 0,415 mg/L;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  0,125 mg/L;  $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  0,0125mg/L;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  220 mg/L;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  185 mg/L;  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  11,15 mg/L;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  4,3 mg/L;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0,0125 mg/L;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  13,9 mg/L e  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  18,65 mg/L (marca MERCK). Além disso foram adicionadas as vitaminas do meio MS: ácido nicotínico 0,5 mg/L; tiamina 0,1 mg/L; piridoxina HCl 0,5 mg/L; glicina 2,0 mg/L e inositol 100 mg/L. Como fitohormônio foi utilizado o IBA (ácido indolbútrico) 0,1 mg/L (marca DUCHEFA) e como fonte de carbono sacarose 30 g/L. O pH foi regulado para 5,8. O meio foi então levado para autoclave e esterilizado por 20 minutos a 121 °C, estando pronto para ser adicionado ao substrato.

#### **3.2.2 Meio de Cultura Sólido**

Preparou-se um meio sólido, conforme descrito no item 3.2.1, com exceção que neste foi acrescentado 3 g/L de ágar ("Plantagar", DUCHEFA<sup>®</sup>), servindo como controle do experimento. Após ser esterilizado em autoclave a 121 °C por 20 minutos, colocou-se 40 mL do meio quente (líquido) em cada frasco de 200 mL. Uma vez solidificado (quando resfriado), este meio ficou pronto para receber as microestacas para o teste de enraizamento.

### **3.3. Substrato de enraizamento**

O material usado para a preparação do suporte alternativo, bagaço de cana-de-açúcar, foi coletado em pontos de venda de caldo de cana-de-açúcar na região de Curitiba. A coleta foi feita em três diferentes pontos.

#### **3.3.1 Preparo do Substrato**

Bagaço de cana-de-açúcar foi utilizado e a seleção foi feita a mão. A parte interna com maior fração de medula e menor proporção de fibras (figura. 5) foi a preterida. O bagaço de cana-de-açúcar foi lavado em água corrente potável suficiente para retirar o excesso de açúcares. Uma nova lavagem foi realizada com água destilada para a eliminação dos sais orgânicos e inorgânicos.

A seleção manual facilitou a escolha das melhores frações do bagaço de cana-de-açúcar, já que o material deve proporcionar uma certa porosidade e absorção para facilitar a oxigenação e o transporte de nutrientes (GEORGE, 1993a; KUKREJA *et al.*, 1986).

O bagaço de cana-de-açúcar contém frações residuais de sais minerais (cinzas), carboidratos, vitaminas, proteínas e fenóis (ICIDCA-GEPLACEA-PNUD, Cuba-1990), cuja remoção é muito importante para se obter um suporte inerte. A remoção dos compostos residuais foi feita pela lavagem do material selecionado com água potável por duas vezes e uma vez com água destilada.

O material foi, a seguir, seco em estufa de bandejas a 90 °C por 24 horas. Em seguida o material foi triturado em moinho de faca martelo. Os fragmentos menores foram, então, refinados até se obter um material com granulometria fina. O material foi classificada por peneiramento em diferentes frações (0,84 mm, 0,84 a 0,177 mm e menores que 0,177 mm).

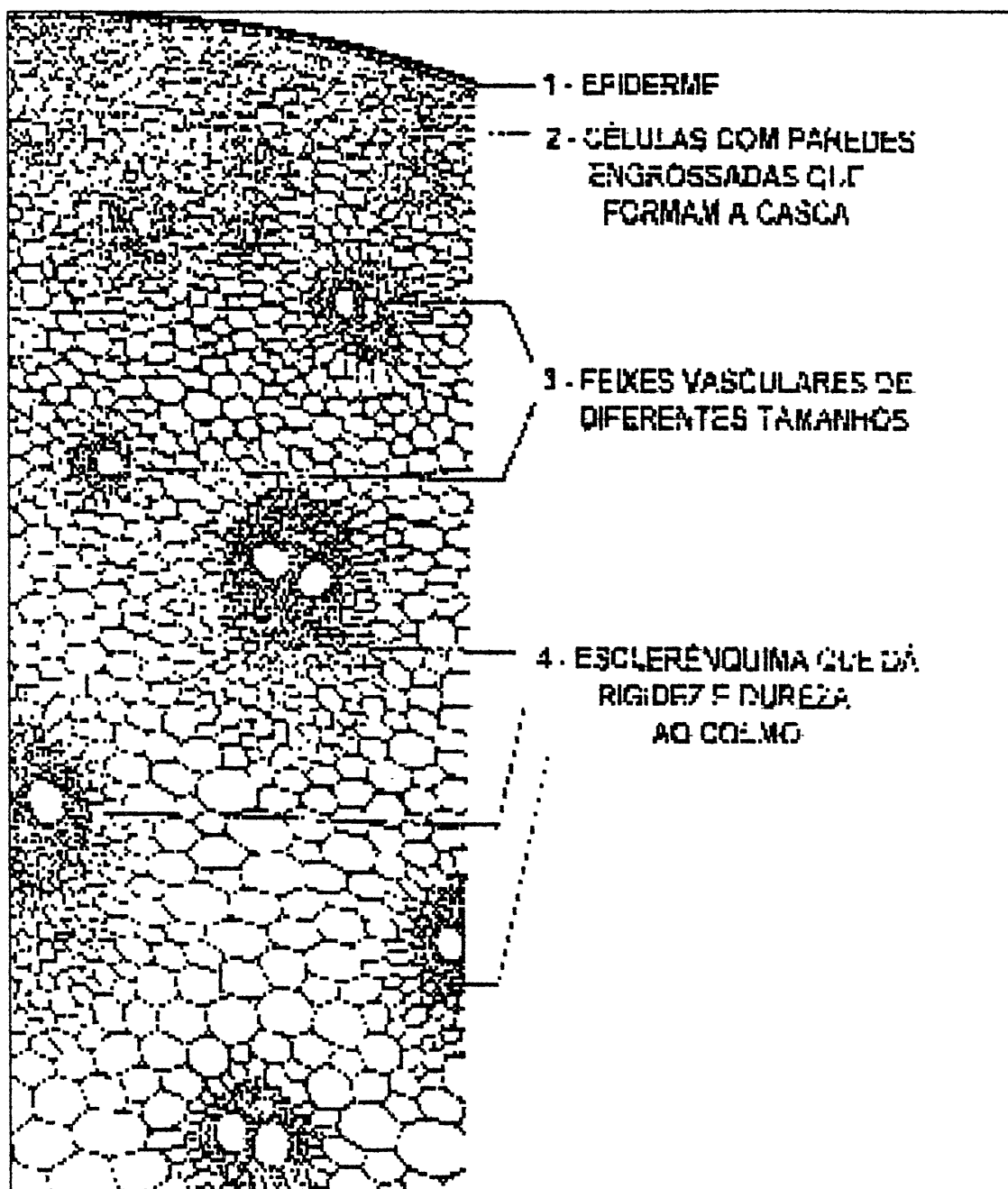


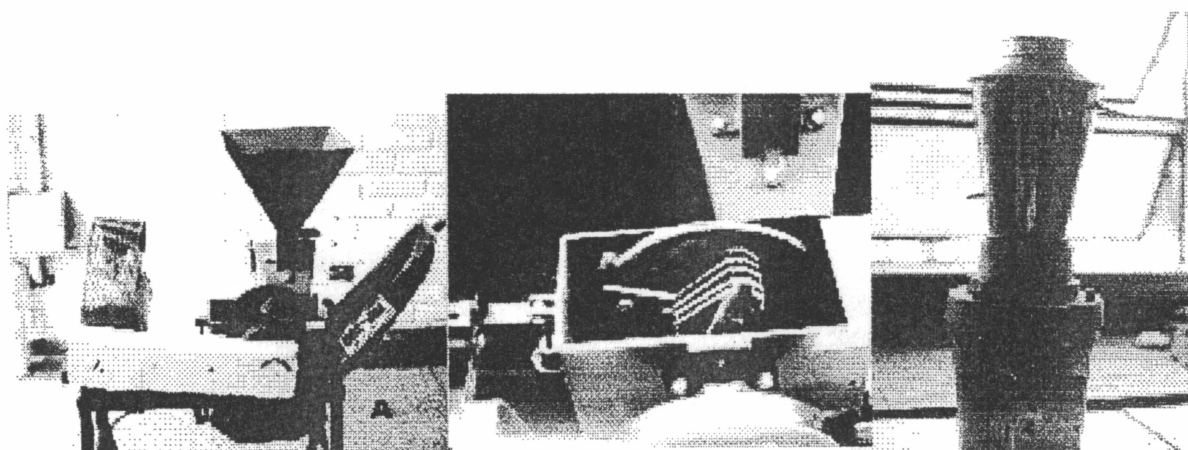
FIGURA 5: VISTA MACROSCOPICA DE UMA SEÇÃO DE UM COLMO DE CANA-DE-AÇÚCAR. AS CÉLULAS ARMAZENADORAS DE AÇÚCAR (PARÊNQUIUMA) SÃO CHAMADAS DE MEDULA (Fonte: MARTIN, 1961).

Nas figuras 6 e 7 mostram-se, respectivamente, o bagaço de cana-de-açúcar utilizado nos ensaios e os equipamentos empregados para a fragmentação do bagaço de cana-de-açúcar.



**FIGURA 6: MATERIAL SELECIONADO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR ANTES DE SER PROCESSADO**

Acredita-se que os compostos fenólicos, como também outros voláteis, foram removidos pelo aquecimento do material lavado durante 24 horas a 90 °C.



**FIGURA 7: FRAGMENTADOR DE TIPO FACA MARTELO USADO PARA TRITURAR O BAGAÇO EM PARTÍCULAS MENORES (A), (B); LIQUIDIFICADOR INDUSTRIAL USADO PARA REFINAR AS PARTÍCULAS MENORES (C)**

Aproximadamente 3g de substrato do bagaço de cana-de-açúcar foi colocado em cada frasco de cultura (200mL de capacidade), fechado com tampa e coberto com fita de PVC. Os

frascos foram levados à autoclave e esterilizados por 20 minutos a 121 °C.

### **3.3.2 Preparo das Microestacas**

Material (brotos) cultivado *in vitro* do porta-enxerto Marubakaido (*Malus prunifolia* Borkh) foi fornecido pelo Centro de Pesquisas de Clima Temperado - EMBRAPA; Pelotas - RS. Os brotos foram sub-cultivados em meio de multiplicação (item 3.1) por aproximadamente 5 vezes. Um mês e meio depois da última transferência, brotos com um comprimento de 2,5 cm foram selecionados e deles foi retirado o excesso de folhas, deixando apenas quatro ou cinco. Para que os brotos não sofressem um stress hídrico maior, durante todo este procedimento, foram parcialmente imersos em água esterilizada após o preparo e antes da repicagem para o meio de cultura sólido e semi-sólido. Estas operações foram feitas em um fluxo laminar (espaço estéril).

## **3.4 Testes**

### **3.4.1 Pré-testes com Substrato**

Ao substrato com granulometria de 0,84 mm, preparado conforme descrito no item 3.3.1, foi adicionado uma quantidade de 35 mL do meio de cultivo líquido (item 3.2.1) num fluxo laminar. Cinco microestacas (item 3.3.2) foram repicadas nos frascos, sendo uma no centro e quatro laterais. Foram utilizados 5 frascos. Os vidros foram fechados com tampa e fita PVC e incubados numa câmara de crescimento a  $26 \pm 5$  °C sob luz fluorescente branca fotoperiódico-18 hrs com densidade de número de fótons de  $40 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  por um período de um mês e meio.



O mesmo foi feito com os substratos de granulometria entre 0,84 a 0,177 mm; e menor que 0,177 mm. Durante um mês e meio, em períodos de 14 dias, foram avaliados o número de raízes formadas, o comprimento das raízes e a altura das plantas. O substrato que obteve o melhor desempenho foi selecionado para a continuidade dos ensaios.

### **3.4.2 Testes com o Substrato**

Ao substrato (bagaço de cana-de-açúcar) com melhor desempenho nos pré-testes, preparado conforme descrito acima (item 3.4.1), foi adicionado 35 mL do meio de cultura líquido (item 3.2.1) em câmara de fluxo laminar. Cinco microestacas (item 3.3.2) foram repicadas em cada frasco, sendo uma no centro e quatro nas laterais. Um total de 50 microestacas foram utilizadas por tratamento. Os frascos (50) foram fechados com tampa e fita PVC e incubados nas mesmas condições descritas anteriormente por um período de dois meses. As avaliações foram feitas aos 12, 18, 28 e 38 dias de cultura, e os parâmetros analisados foram: número de raízes formados por planta, comprimento das raízes e altura de cada planta. A cada avaliação, foram analisadas 8 plantas de frascos independentes.

### **3.4.3 Testes com Meio de Cultura Comercial**

Com o meio de cultivo sólido (3.2.2. foram repetidos os mesmos passos apresentados no item 3.4.3. As avaliações foram feitas paralelamente com os testes do item 3.4.2.

## **3.5 Aspecto das Microestacas e do Meio de Cultura**

Os estudos morfológicos se referem às observações das microestacas na fase de enraizamento: vitrificação, morfogênese e transparência (cor anormal) das plantúlas em geral. Para o meio alternativo foi observado o grau de desidratação.

### **3.6 Estudo Econômico**

Nesta etapa foi feita uma comparação entre os custos ligados ao enraizamento nos dois diferentes meios, o do substrato alternativo (bagaço de cana-de-açúcar) e o meio comercial a base de ágar. Apenas os componentes do meio de enraizamento foram levados em conta no estudo econômico, uma vez que os outros fatores como esterilização, aquecimento e iluminação da câmara de crescimento e demais equipamentos são iguais. Para um melhor entendimento foram feitas planilhas de cálculo para cada meio de cultura. Ver as planilhas na parte de discussão e resultados (item 4.4, tabelas 5 e 6).

### **3.7 Análise Estatística**

Os ensaios realizados foram efetuados usando-se o Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC). Segundo FERREIRA (1991), este modelo permite o uso de qualquer número de tratamentos e repetições; a análise estatística é mais simples e o número de graus de liberdade das plantas é o maior possível. Além disto, este delineamento requer condições experimentais homogêneas, o que se enquadra nos ensaios de laboratório efetuados.

Para comparação dos resultados preferiu-se o teste de Tukey em relação aos demais testes de hipóteses, pois utiliza um valor para julgar todas as diferenças entre as médias, sendo o experimento usado como unidade para a determinação do nível de significância do teste (KOEHLER, 1999).

### **3.8 Fluxograma do Preparo do Suporte Alternativo**

O fluxograma mostrado na figura 9 apresenta de forma esquemática as diferentes etapas envolvidas na preparação do suporte a base de cana-de-açúcar que foi utilizado como substituto ao ágar nos meios de enraizamento.

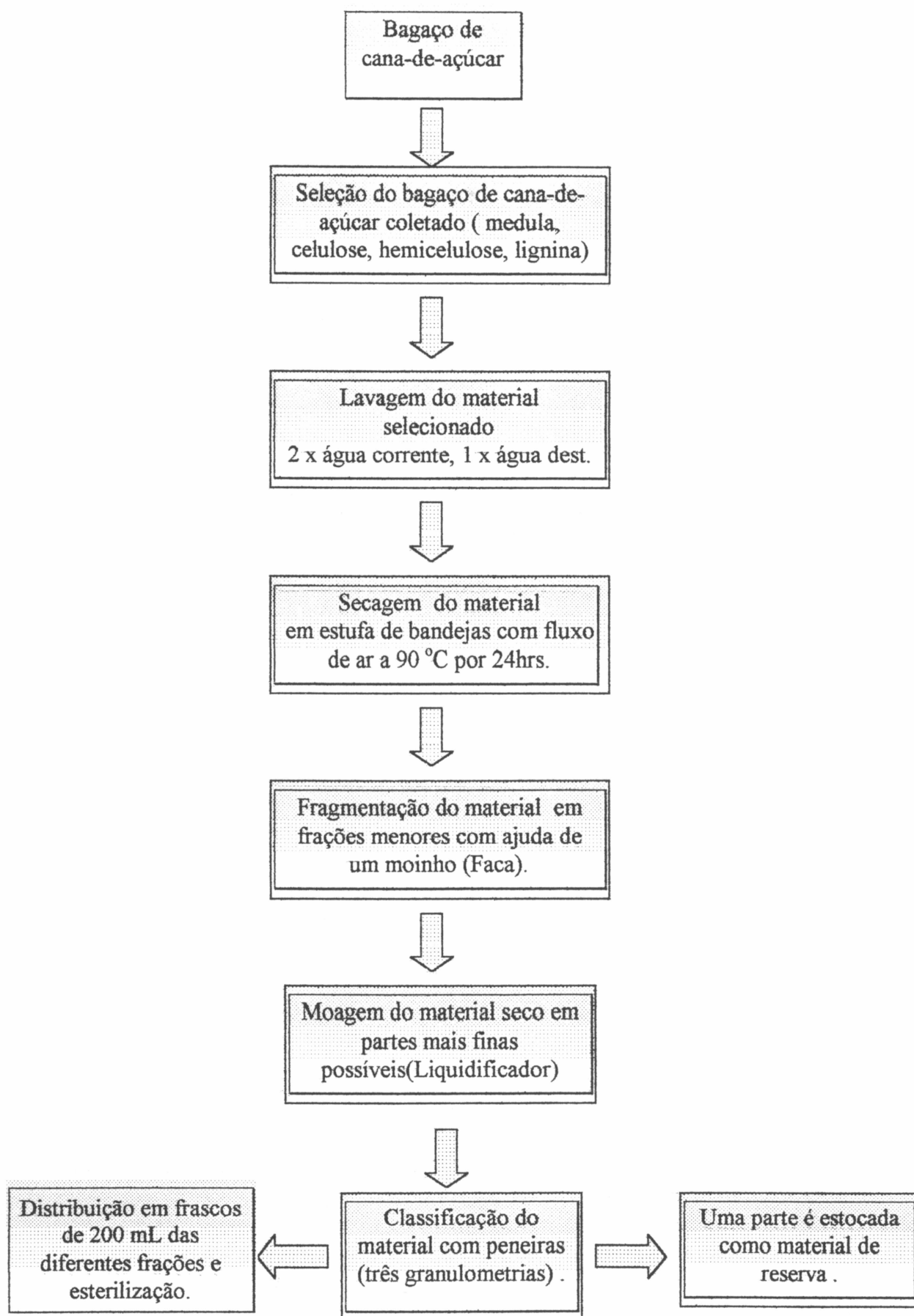


FIGURA 8: FLUXOGRAMA DE COLETA E PROCESSAMENTO DO SUPORTE ALTERNATIVO (BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR) PARA MEIO DE CULTURA

### 3.9 Fluxograma dos Testes Comparativos

O fluxograma mostrado na figura 9 apresenta da forma esquemática as diferentes etapas envolvidas nos testes de enraizamento com as microestacas de porta-enxerto, *Malus prunifolia* nos dois diferentes meios, suporte a base de cana-de-açúcar e ágar convencional (comercial).

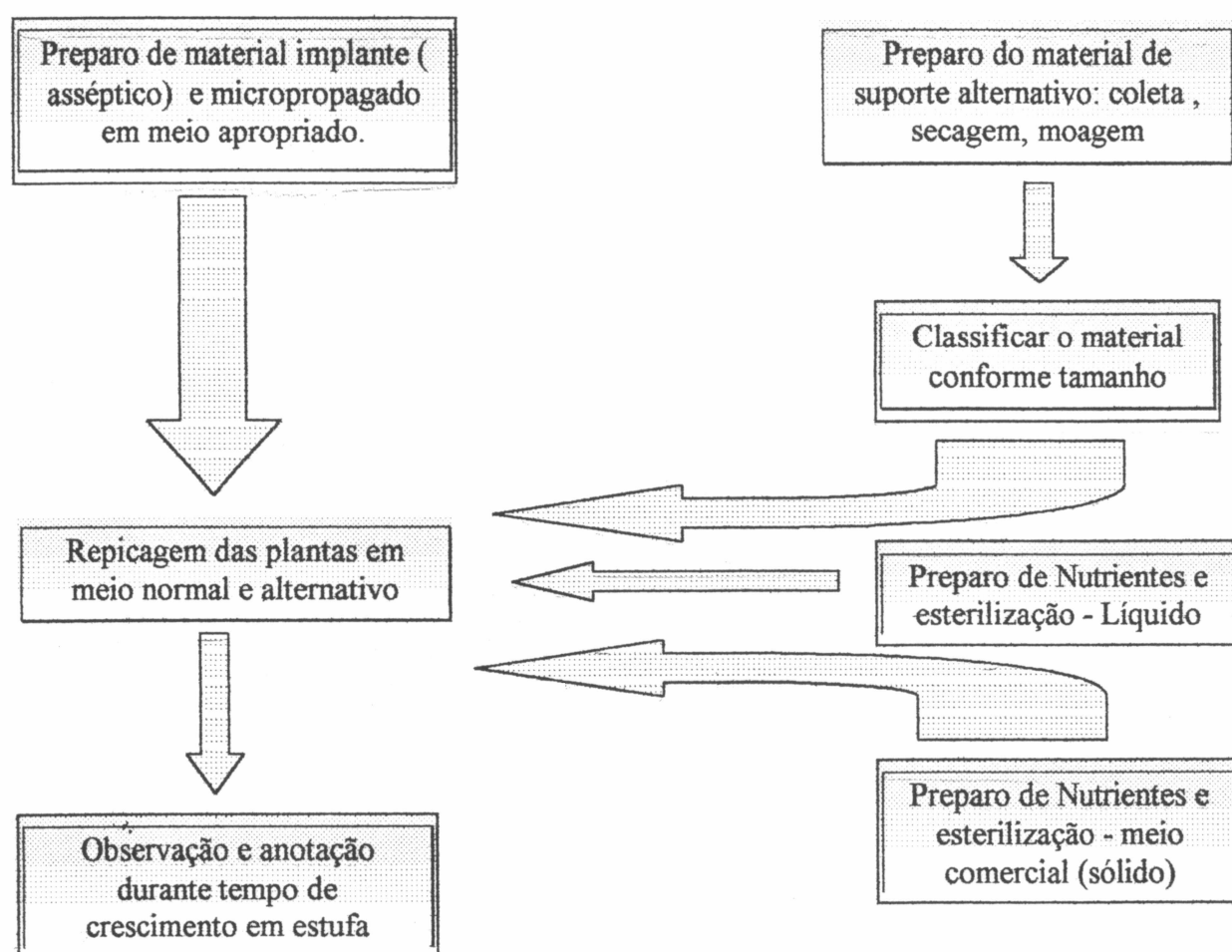


FIGURA 09: FLUXOGRAMA DOS TESTES REALIZADOS COM SUBSTRATO DE CANA-DE-AÇÚCAR E MEIO DE CULTURA CONVENCIONAL, ÁGAR

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Efeito da Granulometria do Bagaço de Cana-de-Açúcar no Processo de Enraizamento de Microestacas de Macieira

A Tabela 1 mostra que a granulometria do suporte tem uma importância significativa no processo de enraizamento de microestacas de macieira. Quando utilizou-se o suporte a base de bagaço de cana-de-açúcar com granulometria média de 0,84 mm, não foi possível obter o enraizamento das microestacas de macieira após 40 dias de cultura, embora se tenha constatado que não houve perda da umidade do suporte durante todo o período do experimento.

TABELA 1- EFEITO DA GRANULOMETRIA DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR SOBRE O ENRAIZAMENTO DE MICROESTACAS DE MACIEIRA (*Malus prunifolia* Borkh).

Granulometria de 0,84 mm				Granulometria de 0,84 a 0,177 mm			Granulometria de < 0,177 mm		
Tempo (dias)	No. médio de raízes*	% de enraiz.	Umidade	No. médio de raízes*	% de enraiz.	Umidade	No. médio de raízes*	% de enraiz.	Umidade
12	0	0	+	0	0	+	5.3a± 0.12	100	+
20	0	0	+	0	0	+	8.1a± 0.31	100	+
30	0	0	+	4.2a± 0.3	40	+	12.2b± 0.11	100	+
40	0	0	+	7.1a± 0.2	50	+	30.4c± 0.09	100	+

\* média por planta ± desvio-padrão. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade; + = aspecto do suporte sem características de ressecamento ;  
= aspecto do suporte com características de ressecamento.

Entretanto quando foi utilizada uma fração com granulometria intermediária, entre 0,84 e 0,177 mm, foi possível obter o enraizamento das microestacas de macieira após 30 dias de cultura, embora a percentagem de enraizamento das microestacas não tinha ultrapassado 50% até o final do experimento. Os melhores resultados de enraizamento das microestacas de

macieira foram obtidos quando foi utilizado o suporte a base de bagaço de cana-de-açúcar com granulometria inferior a 0,177 mm. Com esta granulometria, 100% das microestacas foram enraizadas em apenas 12 dias de cultura e o número médio de raízes chegou a 5 por microestaca e após 20, 30 e 40 dias de cultura chegou a 8, 12 e 30 por microestaca, respectivamente. Com este resultado, foi confirmada a conclusão indicada por PANDEY *et al.* (2001) sobre a importância da granulometria em processos de fermentação em meio sólido.

Acredita-se que a presença da medula no substrato (bagaço de cana-de-açúcar) tem grande importância na obtenção de melhores resultados. A medula tem como característica ser um material absorvente, portanto, quando a solução líquida (meio de crescimento) é adicionada ao substrato, a medula absorve lentamente o líquido até se saturar. Desta forma menor forem as partículas, melhor o contato entre elas, melhor a consistência e, conseqüentemente, melhor o meio semi-sólido. Isto explica porque o bagaço com granulometria inferior a 0,177 mm obteve o melhor resultado quando comparado com as duas outras granulometrias: a de 0, 84 mm e a intermediária de 0,84 mm a 0,177 mm. Desta maneira, os nutrientes (íons minerais), reguladores de crescimento e vitaminas são facilmente absorvidos pelas microestacas ou pelo explante, o que tem por conseqüência um melhor crescimento e enraizamento. Com este argumento formulado pode ser resolvido o problema de difusão reduzida suposto por FAYE *et al.* (1986) e outros problemas causados pela consistência do meio de cultivo indicado por DEBERGH (1982).

Foi também observado que, com a granulometria menor que 0,177 mm, o enraizamento no suporte poroso foi de 100% (Tabela 1). Este resultado pode ser também influenciado pelos fatores dependentes do explante, tamanho da microestaca e a juvenilidade. Nos testes foram usadas microestacas com comprimento inicial de 2,5 cm, o qual é maior que aqueles descritos por DOUGLAS *et al.*, (1989) em ensaios de enraizamento de cultivares de rosas. Como as microestacas usadas para enraizamento no meio de suporte alternativo tiveram

vários números de subculturas (cinco subculturas no próprio Laboratório de Micropropagação Vegetal, Departamento de Botânica – UFPR e um número de subculturas não exatamente conhecido no Laboratório de Centro de Pesquisas de Clima Temperado - EMBRAPA; Pelotas - RS que proporcionou o material), isto deve ter facilitado o enraizamento, uma vez que a taxa de enraizamento aumenta com o número de subculturas. Este resultado pode ser comparado aos testes de enraizamento realizados por MULLINS *et al.* (1986) com estacas de macieira da cv ‘Jonathan’.

O meio de cultura não secou durante todo o período de teste, o que indica que as plântulas podem ficar muito mais que os 40 dias de duração do teste. A umidade relativa suposto (RH) do meio (interior do frasco) deve ser em torno de 99,0 %, usando o método de estimação mencionado por GEORGE, (1993b). A umidade foi observada apenas visualmente para determinar por quanto tempo o meio teria condições de fornecer uma umidade suficiente para o crescimento do material vegetal.

#### **4.2. Avaliação da Resposta dos Estudos de Enraizamento em Suporte a Base de Bagaço de Cana-de-Açúcar em Comparação com o Suporte Tradicional a Base de Ágar.**

Os testes comparativos em relação a quantidade de raízes formadas em meio a base de bagaço de cana-de-açúcar (suporte alternativo) e em meio com suporte normal a base de ágar são apresentados na Tabela 2.

**TABELA 2 - COMPARAÇÃO ENTRE MEIO DE CULTURA SOLIDIFICADO COM ÁGAR E SUPORTE ALTERNATIVO DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR (Granulometria < 0,177mm) QUANTO AO NÚMERO DE RAÍZES DE MICROESTACAS DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO**

Tempo (dias)	No. médio de raízes*, Agar	% de enraiz.	Umidade	No. médio de raízes*, Sup. Alternativo	% de enraiz.	Umidade	Diferença em relação à média* (%)
12	2,13a ± 0,18	100	+	4,13a ± 0,30	100	+	93,42
18	7,00b ± 0,46	100	+	10,00b ± 1,22	100	+	42,81
28	9,00b ± 0,70	100	+	14,60c ± 0,70	100	+	62,23
38	15,25c ± 1,57	100	+	25,40c ± 1,60	100	+	66,52
C.V.	36,44 %						

\* média por planta ± desvio-padrão. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade; + = aspecto do suporte sem características de ressecamento ; - = aspecto do suporte com características de ressecamento. C.V: coeficiente de variação entre as médias

O bagaço de cana-de-açúcar com granulometria inferior a 0,177 mm propiciou um melhor desempenho quanto à formação de raízes. Aos 12 dias de cultivo foi possível observar uma diferença extremamente elevada entre os dois suportes, essa superioridade foi da ordem de 93,4 % em favor do suporte alternativo a base de bagaço de cana-de-açúcar. Acredita-se que o suporte a base de bagaço de cana-de-açúcar possua algum composto químico igual a uma auxina que estimule a indução na formação de raízes. Acredita-se também, que a difusão dessas auxinas ocorra mais facilmente no meio a base de bagaço de cana-de-açúcar quando comparado com o meio tradicional a base de ágar (A), propiciando assim um enraizamento induzido, o que não acontece no meio de suporte solidificado a base de ágar conforme relatado por ROMBERGER e TABOR (1971) e DEBERGH (1982).

Segundo HAISSIG (1986) e COLLET (1988), a presença da auxina é especialmente necessária para a indução de raízes, o que ocorre algumas horas após a aplicação da mesma. Durante os primeiros 12 dias, o contato do meio contendo IBA com a parte das microestacas é total. Os primeiros dias correspondem à fase de indução do enraizamento. Conforme foi



possível observar em nos ensaios, a natureza do suporte a base de bagaço de cana-de-açúcar poderia estar propiciando à planta uma melhor oxigenação através do meio poroso, o que induz um aumento no número de raízes, já que a presença de oxigênio dissolvido no meio de cultivo é de grande importância na fase de indução, conforme descrito por SOFFER e BURGER (1988, 1989).

Observou-se que a diferença das médias do grau de enraizamento entre os dois meios caiu para 42,8% após 18 dias de cultura das microestacas, porém os resultados voltaram a subir para 62,2% após 28 dias de cultivo, resultado esse que praticamente se estabilizou até o final do experimento, após 38 dias de cultura (Tabela 2).

Uma vez determinada a capacidade de formação, indução, organização das raízes, acontece a fase de alongamento das mesmas, onde as partes visíveis aparecem (MONCOUSIN, 1986). Nesta fase de alongamento das raízes, a presença de oxigênio dissolvido no meio do cultivo é igualmente de grande importância, conforme estudos relatados por SOFFER e BURGER (1988, 1989).

A Tabela 3 apresenta a comparação entre o meio de enraizamento alternativo a base de bagaço de cana-de-açúcar e o meio convencional a base de ágar em relação ao comprimento das raízes durante o cultivo das microestacas de macieira. Observa-se também que no caso do comprimento das raízes o meio de enraizamento alternativo a base de bagaço de cana-de-açúcar mostrou ser mais promissor e eficiente que o meio convencional a base de ágar.

O comprimento das raízes foi ligeiramente superior no bagaço de cana-de-açúcar nos primeiros 12 dias de cultivo (4,62%), porém essa diferença entre os dois meios foi significativa após 28 dias de cultura, passando a ser 43,56% superior no meio alternativo em comparação com o meio a base de ágar. Ao final do experimento de 38 dias, a diferença no comprimento das raízes em favor do meio alternativo a base de bagaço de cana-de-açúcar foi de 29,64%.

**TABELA 3 - COMPARAÇÃO ENTRE MEIO SOLIDIFICADO COM ÁGAR E SUPORTE ALTERNATIVO A BASE DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR (Granulometria < 0,177mm) QUANTO AO COMPRIMENTO DAS RAÍZES EM MICROESTACAS DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO**

Tempo (dias)	Compr. média* das raízes, Ágar (cm)	% de enraiz.	Umidade	Compr. médio* das raízes, Sup.alternativo (cm)	% de enraiz.	Umidade	Diferença em relação à média* (%)
12	0,21a± 0,03	100	+	0,31a± 0,06	100	+	4,62
18	0,59b± 0,15	100	+	0,78b± 0,17	100	+	32,20
28	1,01c± 0,08	100	+	1,45c± 0,12	100	+	43,56
38	2,80d± 0,45	100	+	3,63c± 0,36	100	+	29,64
C.V.	1,26 %						

\* média por planta ± desvio-padrão. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade; + = aspecto do suporte sem características de ressecamento; - = aspecto do suporte com características de ressecamento; C.V: coeficiente de variação entre as médias

Os estudos sobre a evolução do comprimento caulinar nos dois meios de enraizamento estão apresentados na tabela 4. Novamente nesse estudo, o meio alternativo de enraizamento por nós desenvolvido mostrou ser mais eficiente quando comparado com o meio tradicional a base de ágar. Os resultados são relativamente semelhantes aos da evolução do comprimento das raízes (tabela 3). Nos primeiros dias de cultura, a diferença entre os dois meios não é muito expressivo, porém se acentua bastante após 18 dias de cultura, atingindo um comprimento caulinar médio superior em 19,93% quando comparado ao meio convencional a base de ágar.

**TABELA 4 - EFEITO COMPARATIVO ENTRE MEIO SOLIDIFICADO COM ÁGAR E SUPORTE ALTERNATIVO A BASE DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR (Granulometria < 0,177mm) SOBRE O COMPRIMENTO CAULINAR DAS MICROESTACAS DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO**

Tempo (dias)	Altura média*, Ágar (cm)	% de enraiz.	Umidade	Altura média*, Sup.alternativo (cm)	% de enraiz.	Umidade	Diferença em relação à média* (%)
12	2,69a± 0,04	100	+	2,79a± 0,04	100	+	3,71
18	3,11a± 0,12	100	+	3,73b± 0,19	100	+	19,93
28	3,40a± 0,10	100	+	4,04b± 0,10	100	+	18,82
38	3,90a± 0,08	100	+	4,58b± 0,10	100	+	17,44
C.V.	0,28 %						

\*média por planta ± desvio-padrão. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade; + = aspecto do suporte sem características de ressecamento; - = aspecto do suporte com características de ressecamento; C.V: coeficiente de variação entre as médias

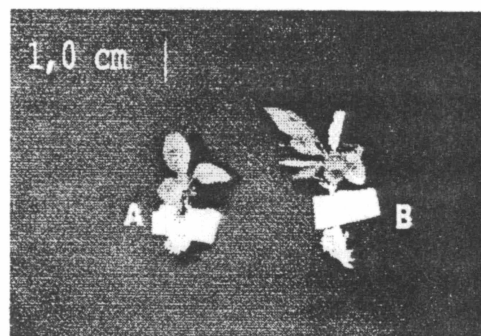
Esse valor se mantém próximo dessa ordem de grandeza até o final do experimento, 38 dias após o início do cultivo. Essa superioridade do meio alternativo a base de bagaço de cana-de-açúcar se deve provavelmente ao número superior de raízes obtido neste meio, portanto, a absorção de nutrientes pela planta deve ser mais eficiente, induzindo, assim, uma atividade metabólica superior, tendo como resposta um melhor crescimento caulinar quando comparado com as plantas cultivadas em suporte a base de ágar.

No meio de suporte a base de ágar devem ocorrer problemas relacionados com os fenômenos de difusão dos nutrientes como a consistência do gel (DEBERGH, 1982). Acredita-se que estes fenômenos não são tão problemáticos no meio alternativo a base de bagaço de cana-de-açúcar, porque no meio com bagaço de cana-de-açúcar há partículas pequenos, meio é poroso, semi-sólido o que favorece a difusão dos nutrientes para as raízes. Como reportado anteriormente, após 38 dias de cultura o meio alternativo proporcionou um crescimento caulinar superior a 17,44%, quando comparado ao meio tradicional a base de ágar.

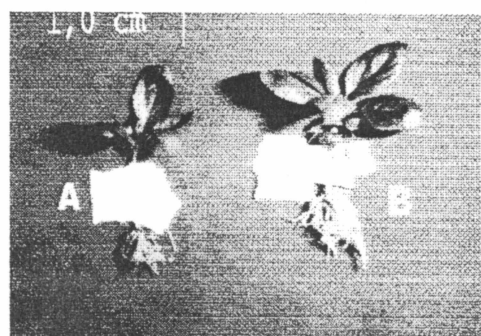
### 4.3 Fisiologia

Na figura 10 estão apresentadas as fotos das plântulas após 12, 18, 28 e 38 dias de cultivo, nos dois diferentes meios de enraizamento estudados. Notamos que após 12 dias pode ser observado a última fase, a fase de alongamento, ocorrido durante o processo de enraizamento da microestaca conforme descrito por MONCOUSIN, (1986) nos dois diferentes suportes: **A**, meio solidificado com ágar e **B**, bagaço de cana-de-açúcar (granulometria menor que 0,177 mm). Estas fotos comparativas ilustram as vantagens do uso do meio a base de bagaço de cana-de-açúcar desenvolvido neste trabalho no que diz respeito ao maior número de raízes formadas, em relação ao maior comprimento das mesmas, bem como à maior altura das plântulas obtidas.

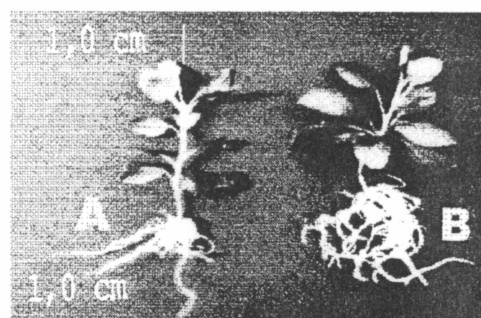
**12 dias**



**18 dias**



**28 dias**



**38 dias**



**FIGURA 10: EVOLUÇÃO DO CRESCIMENTO E DE ENRAIZAMENTO DAS MICROESTACAS DE MARUBAKAIDO FORMADAS NOS DOIS SUPORTES ÁGAR (A) E BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR (B) - Granulometria < 0,177mm) DURANTE O PERÍODO DE 38 DIAS**

Outro fator importante a ser considerado no meio alternativo a base de bagaço de cana-de-açúcar foi que as mudas não apresentaram sinais de hiperhidricidade, já que este fenômeno ocorre nos meios de cultivo líquido, conforme descrito por KROMER (1987) e HUTCHINSON, (1984a, 1985b). Após 48 dias foi possível observar os primeiros sintomas de hiperhidricidade e de morfogenese anormal no meio a base de ágar, porém não no meio alternativo a base de bagaço de cana-de-açúcar. As plântulas no meio de bagaço de cana-de-açúcar ficaram sem sintomas, como pode ser observado na foto comparativa da figura 11. A figura 12 mostra o estado das plântulas *in vitro* sem aparência dos sintomas citados anteriormente nos dois diferentes meios, enquanto na figura 13 são vistos os sintomas defeituosos como morfogenese anormal e hiperhidricidade no meio a base de ágar (A).

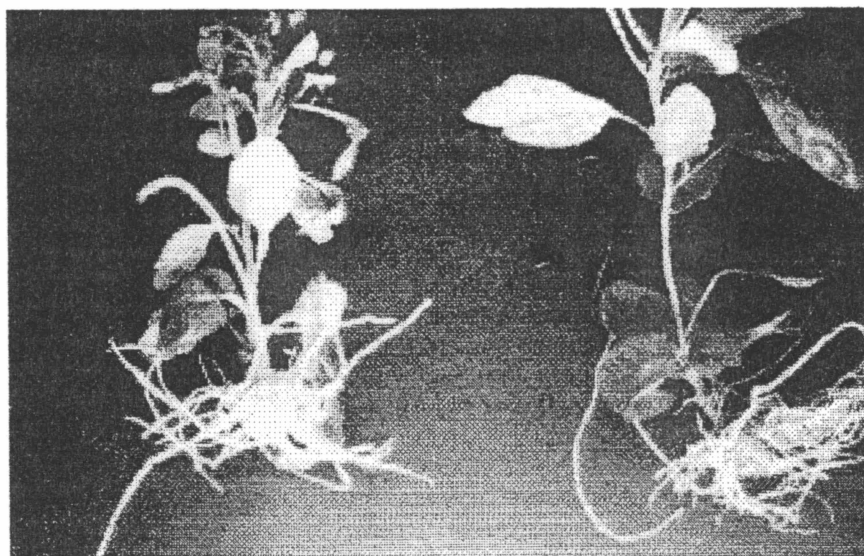


FIGURA 11: ENRAIZAMENTO DAS MICROESTACAS DE MARUBAKAIDO OBTIDO NO MEIO COM ÁGAR (A) E NO MEIO ALTERNATIVO, BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR FINO (B) APÓS 48 DIAS.

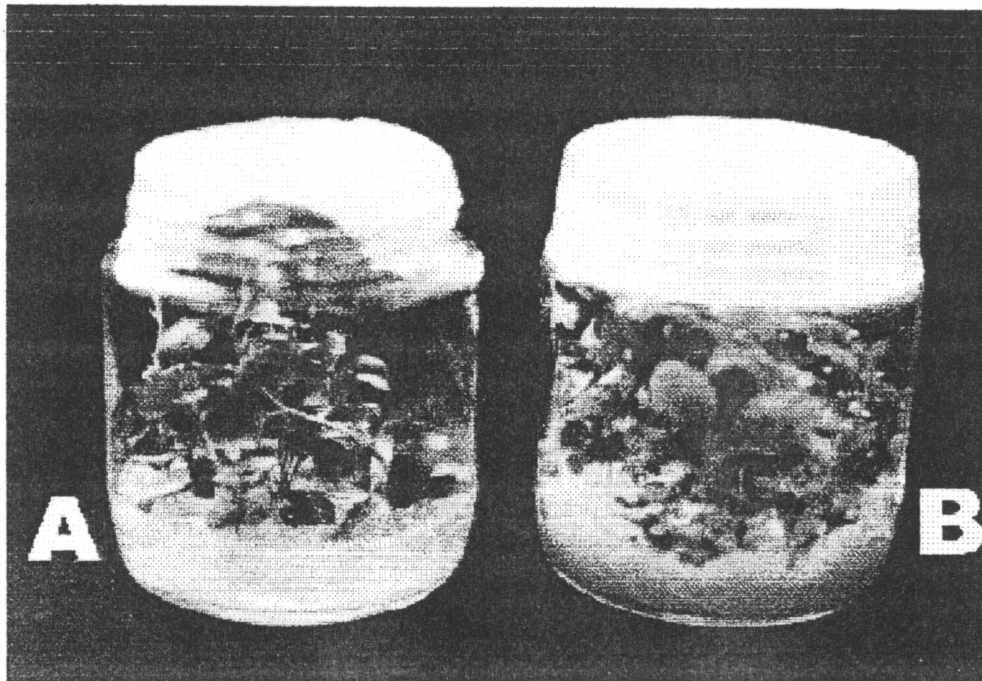


FIGURA 12: COMPARAÇÃO DAS PLÂNTULAS ENRAIZADAS NO MEIO COM ÁGAR (A) E NO MEIO ALTERNATIVO, BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR FINO (B) APÓS 38 DIAS *IN VITRO*.

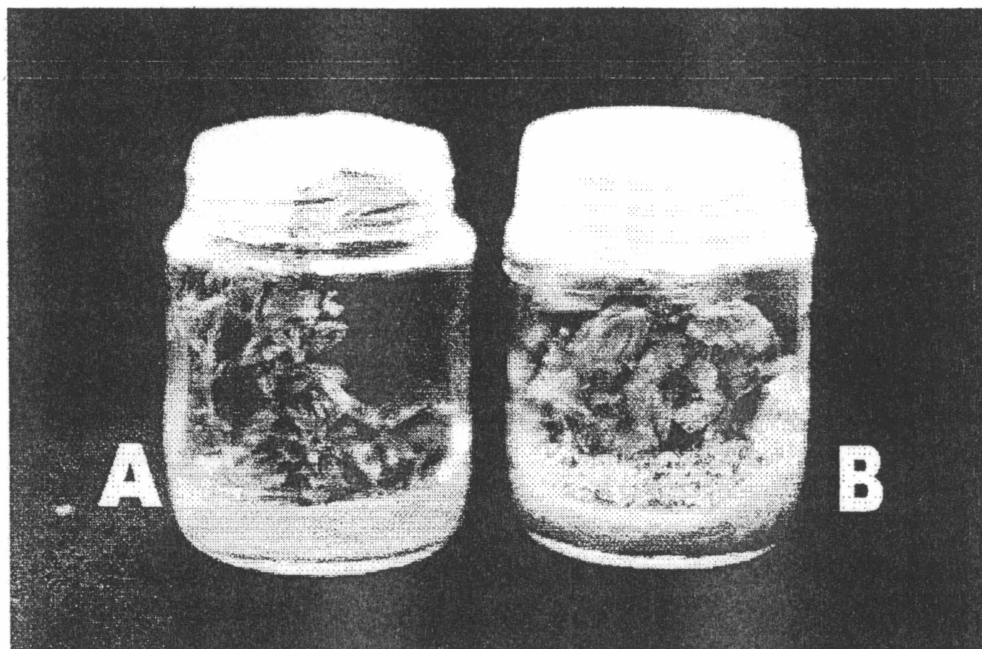


FIGURA 13: COMPARAÇÃO DAS PLÂNTULAS ENRAIZADAS NO MEIO COM ÁGAR (A) E NO MEIO ALTERNATIVO, BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR FINO (B), APÓS 48 DIAS *IN VITRO*.

A figura 14 mostra as raízes formadas nos dois diferentes meios pelo fundo dos frascos. Observamos que no meio a base de bagaço de cana-de-açúcar (B) forma-se um número significativo de raízes quando comparado com o meio a base de ágar (A).

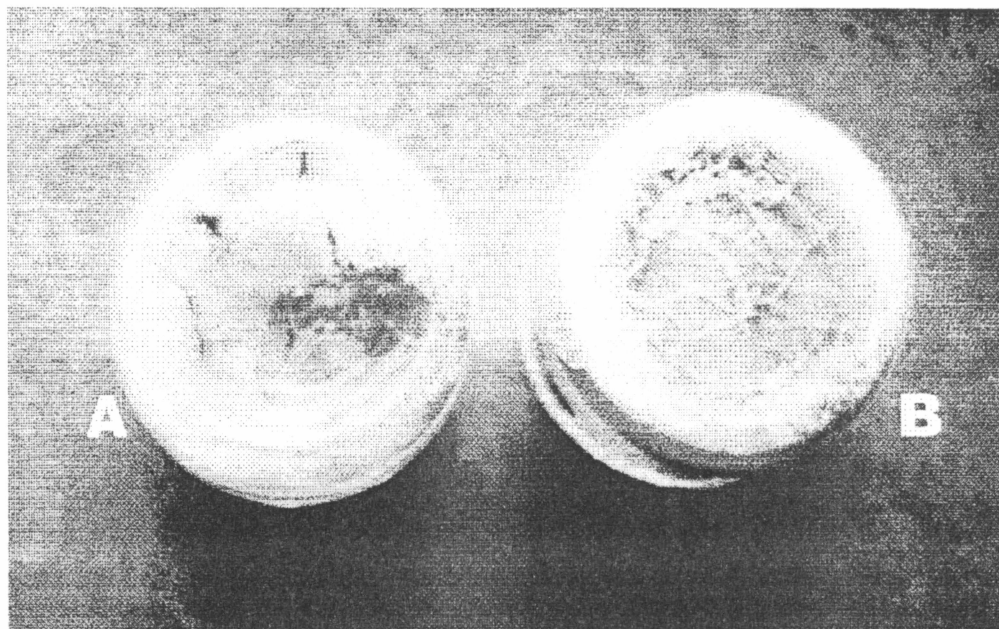


FIGURA 14: VISUALIZAÇÃO DAS RAÍZES OBTIDAS NO MEIO COM ÁGAR (A) E NO MEIO ALTERNATIVO A BASE DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR (B), APÓS 42 DIAS



#### 4.4 Estudo Econômico Comparativo entre os dois Meios de Enraizamento

Nas tabelas 5 e 6 são apresentadas as planilhas para o cálculo do custo para 1000 plantas enraizadas com sucesso nos dois meios, ágar (comercial) e bagaço de cana-de-açúcar fino (< 0,177 mm) respectivamente.

**TABELA 5 - PLANILHA DE CÁLCULO DOS CUSTOS DO MEIO DE CULTURA A BASE DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR PARA 1000 PLANTAS**

Meio de enraizamento de macieira- bagaço fino		Espécie vegetal :		Marubakaido	
Quantidade : 500ml		* = fator de divisão do meio			
Compostos	Conc. Solução estoque (mL)		Quantidade da Solução estoque		Custo parcial US\$
Sais : veja anexo I	A		41,25	g	2,26875
MS*	B		47,5	g	2,85
* = 2	C		2,5	g	0,125
	D		2,5	g	0,125
	E		2,5	g	0,125
	F		2,5	g	0,125
Vitaminas:	A		0,25	mg	0,0325
	P		0,25	mg	0,37
	T		0,05	mg	0,117
	G		1	mg	0,159
Outros :					
IBA	0,1	mg/ml	0,05	mg	0,254
mio inositol	50	Mg	0,05	g	0,0225
Açúcar:					
SACAROSE			15	g	0,75
Custo (US\$)				Subtotal	4,51437 US\$
					5
Suporte :			3,5	g	0,035 R\$
bag. de cana fina					
				Custo total :	R\$
					12,90
Cotação de dólar :	2,85			Número da plântulas enraizadas com sucesso:	70
Meio suficiente p/ 14 frascos =	12,90	R\$			
1 frasco contém 5 plantas					
Custo parcial de 1000 plantas =	184,30	R\$			

**TABELA 6 - PLANILHA DE CÁLCULO DOS CUSTOS DO MEIO DE CULTURA A  
BASE DE ÁGAR PARA 1000 PLANTAS**

Meio de enraizamento de macieira- meio  
comercial (ágar). Espécie vegetal : *Marubakaido*  
Quantidade : **500ml** \* =fator de divisão  
do meio

Compostos	Conc. Solução estoque ( mL)		Quantidade da Solução estoque		Custo parcial (US\$)
Sais : veja anexo I	A		41,25	g	2,26875
MS*	B		47,5	g	2,85
* = 2	C		2,5	g	0,125
	D		2,5	g	0,125
	E		2,5	g	0,125
	F		2,5	g	0,125
Vitaminas :	A		0,25	mg	0,0325
	P		0,25	mg	0,37
	T		0,05	mg	0,117
	G		1	mg	0,159
Outros :					
IBA	0,1	mg/ml	0,05	mg	0,254
Mio-inositol	50	Mg	0,05	g	0,0225
Açúcar:					
SACAROSE			15	g	0,75
Ágar :					
Plant ágar			3,5	g	0,525
Custo (US\$)			Custo total	5,04	US\$
				14,362	R\$
Cotação de dólar : 2,85			Número da plântulas enraizadas com sucesso:	70	
Meio suficiente p/ 14 frascos =	14,36	R\$			
1 frasco contém 5 plantas					
Preço parcial para 1000 plantas:	205,17	R\$			

Pelos cálculos realizados, obtêm-se uma diferença de 13,35 % ou dois centavos (R\$ 0,02) por planta enraizada em relação aos dois meios de enraizamento, o que indica que uma planta enraizada em meio de suporte de bagaço de cana-de-açúcar é 13,35 % mais barata em relação a uma plântula enraizada em um meio comercial a base de ágar.

Esses resultados demonstram que a substituição de suportes a base de ágar nos meios de crescimento, por suportes alternativos de baixo custo (como o bagaço de cana-de-açúcar) é uma excelente alternativa, não só devido ao fato de se conseguir uma redução nos custos de

produção, mas também em razão da obtenção de plantas mais sadias, com um número maior de raízes, um comprimento superior das mesmas e também uma planta melhor desenvolvida. Essa redução de custos nas técnicas de cultura de tecidos é de extrema importância para se ampliar a aplicação comercial dessa técnica na produção de mudas em escala industrial.

## 5. CONCLUSÕES

Nesses estudos buscou-se avaliar as possibilidades do uso de um substituto ao ágar nos meios de enraizamento de microestacas em processos de micropropagação vegetal.

Na seleção do substrato alternativo foram consideradas varias características: natureza química, estrutura física, capacidade de absorção de água, granulometria, porosidade, disponibilidade de grandes volumes e preços de mercado. Os custos do processamento dessa matéria prima para ser transformada em suporte (lavagem, secagem, moagem, peneiramento, classificação) também foram considerados.

Dentre o substrato alternativo avaliado, foi escolhido como melhor material o bagaço de cana-de-açúcar moído com granulometria inferior a 0,177 mm. Esse material constitui resíduo da indústria sucro-alcooleira e é produzido em grandes volumes no Brasil sendo seu único uso até o presente momento como matéria para a geração de calor e energia pela queima para a indústria e como volumoso na alimentação de ruminantes.

Portanto, as principais conclusões do trabalho são:

- que os resultados obtidos com o bagaço de cana-de-açúcar no enraizamento de microestacas da macieira porta-enxerto, Marubakaido (*Malus prunifolia*) são bastante promissores, inclusive em razão de que todos os testes realizados foram comparados com o meio tradicional comercial a base de ágar.
- quanto às respostas fisiológicas das plântulas, em meio de crescimento (enraizamento) o suporte a base de bagaço de cana-de-açúcar apresentou sempre o melhor desempenho quando comparado ao meio comercial a base de ágar, inclusive superando este último por não apresentar os efeitos negativos de vitrificação e morfogênese após 48 dias de cultura.

- que a técnica utilizado reduziu os custos com 13,35 % ou dois centavos (R\$ 0,02) por planta enraizada em relação aos dois meios de enraizamento, aumentou o numero de enraizamento com 66,52 %, aumentou o comprimento das raízes com 29,64 % e aumentou o crescimento caulinar para superior a 17,44 % em relação
- que os resultados obtidos com o bagaço de cana-de-açúcar para o enraizamento de microestacas abrem novas perspectivas para a técnica da cultura de tecidos vegetais *in vitro*, por permitir em supressão do processo de lavagem das plântulas realizadas em meio a base de ágar; reduzir em o tempo de transferência das plântulas para a câmara de aclimatização; reduzir em os danos físicos, bem como as infecções.
- que as técnicas da cultura de tecidos não são muito difundidas no Brasil, justamente em função dos altos custos das matérias-primas dos meios de cultivo. Desta forma, qualquer progresso que se faça no sentido de reduzir esses custos, tendo ainda uma melhor resposta da planta em termos de aumento da produtividade, será de importância significativa para um país agrícola como o Brasil.

Vale a pena ressaltar que o emprego do suporte a base de cana-de-açúcar na confecção de meios de enraizamento na técnica de cultura de tecidos poderá dar origem a plantas mais saudias e produtivas.

Acredita-se que esse trabalho contribuiu para a redução dos custos de produção de mudas obtidas pela técnica de cultura de tecidos vegetais.

## **6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS**

Os resultados mostraram a possibilidade da utilização do bagaço de cana-de-açúcar em técnicas de micropropagação vegetal, porém novas investigações devem ser realizadas para que se possa utilizar esta técnica inovadora de maneira mais ampla e em escala comercial.

Sugere-se assim que trabalhos futuros devam ser ainda implementados, entre esses:

- Testar outras variedades de plantas que são difíceis de enraizar (café, pêssego, acácia e etc.);
- Estudar o comportamento das plantas obtidas neste suporte na fase de aclimatização e crescimento exterior (estufa, canteiro e campo);
- Desenvolver um biorreator específico para a produção comercial de mudas utilizando a técnica desenvolvida;
- Testar o suporte a base de bagaço de cana-de-açúcar em outras fases da micropropagação vegetal (obtenção de calos, de embriões somáticos e fase de multiplicação da micropropagação);
- Misturar o material com outros (compostos orgânicos) e estudar o seu efeito em técnicas de micropropagação vegetal;
- Realizar a análise química e morfológica do bagaço de cana-de-açúcar antes e após a secagem;
- Monitorar e medir as atividades de água ( $A_w$ ) nos suportes dos dois meios (comum e alternativo).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALDERSON, P.G.; McKINLESS, J.; RICE, R.D. 1988. Rooting of cultured rose shoots. *Acta Hort*, v.226, p.175-182.

ALVAREZ, R.; NISSEN S.J.; SUTTER E.G. 1989. Relationship between indole-3-acetic acid levels in apple (*Malus pumila* Mill.) rootstocks cultured *in vitro* and adventitious root formation in the presence of indole-3-acetic acid. *Plant Physiology*, v. 89, p.439-443.

BOXUS, Ph. 1978. The production of fruit and vegetable plants by *in vitro* culture. Actual possibilities and perspectives, p. 44 -58 in Hughes *et al.* (eds.)1978 (q.v.).

BRAINERD, K.E.; FUCHIGAMI, L.H. 1981. Aclimatization of aseptically cultured apple plants to low relative humidity. *J. Am. Soc. Hortic. Sci*, v.106, p.515-518.

CHANDRA, G.R.; GREGORY, L.E.; WORLEY, J.F. 1971. Studies on the initiation of adventitious roots on mungbean hypocotyl. *Plant & Cell Physiol* n.12, p.317-324.

CHATURVEDI, H.C.; SHARMA, A.K.; PRASAD, R.N. 1978. Shoot apex culture of *Bougainvillea glabra* 'Magnifica'. *Hortscience*, 1 v.13, p.36.

CHENG, T.Y.; VOQUI, T.H. 1977. Regeneration of Douglas fir plantlets through tissue culture. *Science*, n.198, p.306-307.

CHEETHAM, R.D.; MIKLOICHE, C.; GLUBIAK, M.; WEATHERS, P. 1992. Micropropagation of recalcitrant male asparagus clone (MD 22-8). *Plant Cell Tiss. Organ Culture*, n. 31, p.15-19.

COLLET, G.F. 1988. Improvement to induce rooting of fruit trees *in vitro*. *Acta Hort*, v.227, p.318-323.

DEBERGH, P. 1982. Physical properties of culture media, p. 135-136 in FUJIWARA, A. (ed.) 1982 (q.v.).

DEBERGH, P.; HARBAOUI, Y.; LEMEURE, R. 1981. Mass propagation of globe artichoke (*Cynara scolymus*): evaluation of different hypotheses to overcome vitrification with special reference to water potencial. *Physiol. Plant*, n.53, p.181-187.

DEBERGH, P.C.; MAENE, L.J. 1981. A scheme for the commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. *Scientia Hort*, n.14, p.335-345.

DOUGLAS, G.C.; RUTLEDGE, C.B.; CASEY, A.D.; RICHARDSON, D.H.S. 1989. Micropropagation of floribunda, ground cover and miniature roses. *Plant Cell Tiss. Organ Cult*, n.19, p.55-64.

ENDRESS, R. 1994. *Plant Cell Biotechnology*. Springer-Verlag, Berlim, p.28-42.

FAUST, M.; FOGLE, H.W. 1980. Potential changes in fruit growth resulting from use of tissue cultures. In: Proc. Conf. Nursery Production of Fruit Plants Through Tissue Culture - Applications and Feasibility. U.S. Dept. Agr., Sci. Educ. Adm., Beltsville, MD. ARR-NE-11, p. 102-106.

FERREIRA, M.E.; CALDAS, L.S.; PEREIRA, E.A. 1998. Aplicações da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A., ed. *Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas*. Brasília: Embrapa - SPI / Embrapa-CNPq, v.1, p.21-43.

FERREIRA, P.V. 1991. Estatística experimental aplicada à agronomia. Maceió- Edufal, p. 61-147.

FOURNIOUX, J.C.; BESSIS, R. 1993. Use of carbon dioxide enrichment to obtain adult morphology of grapevine *in vitro*. Plant Cell Tiss. Organ Cult, n.33, p.51-57.

GEORGE, E.F. 1993a. Plant propagation by tissue culture, Part 1- The Technology, Exegetics Limited.

GEORGE, E.F. 1993b. Plant propagation by tissue culture, Part 2- In Practice, Exegetics Limited.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. 1998. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A., ed. *Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas*. Brasília: Embrapa-SPI / Embrapa-CNPq, v.1, p.183-260.

HAISSIG, B.E. 1986. Metabolic processes in adventitious rooting of cuttings. p. 141-189, In: JACKSON, M.B. (ed.) 1986 (q.v).

HUTCHINSON, J.F. 1984a. *In vitro* propagation of *Dionaea muscipula* Ellis (Venus Fly trap). Scientia Hort., v.22, p.189-194.

HUTCHINSON, J.F. 1985b. Micropropagation of "Northern Spy apple rootstock. Comb. Proc. Int. Plant Prop. Soc. 1984, n.34, p.38-48.

ICIDCA-GEPLACEA-PNUD. 1990. Manual de los Derivados de la Caña de azúcar. 2ª ed. Cuba.

Instituto Adolfo Lutz. 1985. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos normais. Normas analíticas de Instituto Adolfo Lutz 3<sup>rd</sup>, São Paulo, IMESP. p.189-192, 195-196.

JAMES, D.J.; THURBON, I.J. 1981a. Shoot and Root initiation *in vitro* in the apple rootstock M.9. Journ. Hort. Sci., n.56, p.15-20.

JAMES, D.J.; THURBON I.J. 1981b. Fenolic Compounds and other factors controlling rhizogenesis *in vitro* in the apple rootstock M.9 and M.26. Z. Pflanzenphysiol, v.105, p.11-20.

JONES, O. P.; HATFIELD, S.G.S. 1976. Root initiation in apple shoots cultured *in vitro* with auxins and phenolic compounds. Journal of Hort. Science, Alexandria, n.51, p.495-499.



KANG, K.S.; VEEDER, G.T.; MIRRASOUL, P.J.; KANEKO, T.; COTRELL, W. 1982. Agar-like polysaccharide produced by a *Pseudomonas* species: Production and basic properties. *Appl. Environ. Microbiol.* n.43, p.1086-1091.

KOEHLER, H.S. 1999. Estatística Experimental. UFPR- Curitiba, Paraná, p. 99.

KROMER, K. 1987. Hardening and rooting of M.7 apple rootstock cultures. p. 119-122 in DUCATÉ *et al.* (eds.) 1987 (q.v.).

KUKREJA, A.K.; MATHUR, A.K.; ASHUDA, P.S. 1986. Morphogenic potencial of foliar explants in *Duoisia myoporoides* R. Br. (Solanaceae). *Plant Cell Rep.*, n.5, p.27-30.

LEME, JR. J.; BORGES, J.M. 1965. Açúcar de cana. Viçosa: Imprensa universitária da Universidade Rural de Minas Gerais, p. 48-51.

LYDON, J.; ZIMMERMAN, R.H.; FORDHAM, I.M.; LUSBY, W.R. 1993. Tissue culture and alkaloid production of *Erythroxylum coca* var. *coca*. *J. Herbs Spices Medicinal Plants* 2: p.3-14.

MACKAY, W.A.; KITTO, S.L. 1988. Factors affecting *in vitro* shoot proliferation of French tarragon. *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, v.113, p.282-287.

MARTIN, A. 1961. The growth and development of the sugarcane plant. *South African sugar journal*, v.41, p.1001-1009.

MICHAUX-FERRIÈRE, N.; BIEYSSE, D.; ALVARD, D.; DUBLIN, P. 1989. Etude histologique de l'embryogenèse somatique chez *Coffea arabica*, induite par culture sur milieux uniques de fragments foliaires de géotypes différents. *Café Cacao Thé*, XXXLII (4): p. 207- 217.

MONCOUSIN, CH. 1986. Biochemical events in mono-nodal stem cuttings of *Vitis* hybrid during *in vitro* adventitious rooting. p. 148. In SOMERS *et al.* (eds.) 1986 (q.v.).

MONCOUSIN, CH. 1991b. Rootings of microcuttings: Fundamental aspects. *Acta Hort.*, n.289, p.311-317.

MONCOUSIN, CH.; GASPAR, TH. 1983. Peroxidase as a marker for rooting improvement of *Cynara scolymus* L. cultured *in vitro*. *Biochem. Physiol. Pflanz.* v.178, p.263-271.

MULLINS, M.G.; SRISKANDARAJAH, S.; NOITON, D. 1986. Enhanced capacity for adventitious root formation in apple microcuttings by conditioning of mother cuttings. *Acta Hort.*, n.179, p.873.

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

NORIEGA, C.; SÖNDAHL, M.R. 1993. Arabica coffee micropropagation through somatic embryogenesis via bioreactors. *ASIC*, 15º Colloque, Montpellier, França, p.73-81.

OLIVEIRA, M.F.; FORTES, G.R. 1996. Seleção *in vitro* de Material Somático do porta-enxerto de Macieira, cv. Marubakaido (*Malus Prunifolia*) para Tolerância ao Alumínio. Reunião Estadual de Biotecnologia vegetal. Porto Alegre –RS.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; LEON, J.A.R.; NIGAM, P. 2001. Solid-state Fermentation in Biotechnology. Asistech Publishers, p.29-31.

PARANHOS, S.B. 1987. *Cana de açúcar. Cultivo e Utilização*. Fundação Cargill, Campinas, v.2, p.761-765.

PETER, J.D. 1995. Plant hormones - Physiology, Biochemistry and Molecular Biology- 2ed. Dordrecht. Ch. B, p. 39,40.

QUOIRIN, M.; BOXUS, PH.; GASPAR, TH. 1974. Root initiation and isoperoxidases of stem tip cuttings from mature prunus plants. *Physiol. Veg.*, n.12, p.165-174.

QUOIRIN, M. 1996. Manual de Cultura de Tecidos Vegetais *in vitro*. UFRJ, Rio de Janeiro.

REGULY, J.C. 1998. Biotecnologia dos Processos Fermentativos. v.2. Pelotas: Editora Universitária – UFPel. p. 222.

ROMBERGER, J.A.; TABOR C.A. 1971. The *Picea abies* shoot apical meristem in culture. I. Ágar and autoclaving effects. *Am. J. Bot.* 58, 131-140.

SEAB-PR - Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento do Paraná. 1999. Acompanhamento da situação agropecuária do Paraná. p.8-22.

SHARMA, A.K., CHATURVEDI, H.C.; PRASAD, R.N. 1981a. Clonal propagation of *Bougainvillea glabra* 'Magnifica' through shoot apex culture. *Plant Cel Tiss. Organ cult.*, n.1, p. 33-38.

SHARMA, A.K.; PRASAD, R.N.; CHATURVEDI, H.C. 1981b. A clonal propagation of *Bougainvillea glabra* 'Magnifica' through shoot apex culture. *Plant Cell. Tiss. Organ. Cult.*, n.1, p.33 - 38.

SOCCOL, C. R.; KRIEGER, N. 1998. Brazilian experiments for the valorization of the agroindustrial residue by solid state fermentation. in: *Advances in Biothechnology*. Educational Publishers & Distributor, p. 25-40.

SOCCOL, C. R.; LEIFA, F.; WOICIECHOWSKI, A.L.; BRAND, D.; MACHADO, C. M. M.; SOARES, M.; CHRISTEN, P.; PANDEY, A. 2000. Experiência brasileira na valorização biotecnológica de subprodutos da agroindústria do café. in: *proceedings of III, International Seminar on Biotechnology in the Coffee Agroindustry*. Londrina-Pr-Brasil, IAPAR/IRD, p. 323-328.

SOCCOL, C. R. 1996. Agroindustrial applications of solid state fermentation processes. In: GALINDO, E. (ed.), *Fronteras en biotecnologia y bioingenieria*. Sociedad mexicana de Biotecnologia y Biengeneria, p. 349-358.

SOCCOL, C.R.; STERTZ, S.C.; RAIMBAULT, M.; PINHEIRO, L.I. 1995a. Biotransformation of solid waste from cassava starch production by *Rhizopus* in solid state fermentation. part I - Screening of strains. *Arq. Biol. Tecnol.*, 4 v. 38, p.1303-1310.

SOCCOL, C.R.; STERTZ, S.C.; RAIMBAULT, M.; PINHEIRO, L.I. 1995b. Biotransformation of solid waste from cassava starch production by *Rhizopus* in solid state fermentation. part II - optimization of the culture conditions and growth kinetics. *Arq. Biol. Tecnol.*, 4 v. 38, p. 1311-1318.

SOCCOL, C.R.; MOHAN, R.; QUOIRIN, M.G. Uso do bagaço de cana-de-açúcar como material de suporte na fase de enraizamento em processo de micropropagação vegetal. Nac. INPI n. 931/2001, Curitiba, Paraná-Brasil.

SOFFER, H.; BURGER, D.W. 1988. Studies on plant propagation using the aero-hydroponic method. *Acta Hort.*, n. 230, p. 261-269.

SOFFER, H.; BURGER, D.W. 1989. Plant propagation using the aero-hydroponic systems. *Hort. Science*, v.24, p.154.

SRIKANDARAJAH, S.; SKIRVIN, R.M.; ABU-QUAoud, H. 1990a. The effects of some micronutrients on adventitious root development on scion apple cultivars in vitro. *Plant Cell Tissue. Organ Cult.*, v.21, p.185-189.

SUTTER, E.; LANGHANS, R.W. 1981. Problems posed by microplant morphology. *Comb. Proc. Int. Plant Prop. Soc.* 1981, n. 31, p.563- 566.

SUTTER, E.; LANGHANS R.W. 1981. Abnormalities in *Chrysanthemum* regenerated from long-term cultures . *Ann. Bot.*, n. 48, p.559-568.

TANAKA, M.; HIRANO, T.; GOI M.; HIGASHIURA, T.; SASAHARA, H.; MURASALI, K. 1991. Practical application of a novel disposable film culture vessel in micropropagation. *Acta. Hort.*, n. 300, p.77-84.

TURNER, D.A.; COX, P.N.; PEEL E. 1987. Micropropagation of some wild species of the genus *Lycopersicon*. *Acta Hort.*,n.212, p.667-670.

WILCOX, E.J.; SELBY, C.; WAIN, R.L. 1978. Studies on plant growth-regulating substances; The cytokinin activity of some substituted *benzyloxipurines*. *Ann. Appl. Biol.*, n. 88, p.439 - 444.

WILCOX, E.J.; SELBY, C.; WAIN, R.L. 1981. The cytokinin activity of 6- $\alpha$ -alkyl-benzyloxipurines . *Ann. Appl. Biol.*, n. 97, p. 221-226.

ZANOL, C.G.; FORTES, G.R.; SILVA, J.B. 1996. Protocolo de Enraizamento *in vitro* para o porta-enxerto de Macieira cv. Marubakaido (*Malus Prunifolia*). Reunião Estadual de Biotecnologia vegetal, Porto Alegre -RS, 1996.

ZIMMERMAN, R.H. 1984a. Apple. In: SHARP, W.R.; EVANS, D.A; AMMIRATO, P.V; YAMADA, Y. Ed. Handbook of Plant Cell Culture. New York: Macmillan Publishing Company, v.2, p.369-395.

ZIMMERMAN, R.H. 1984a. Ch. 14 - Apple. pp. 369-395 *in* SHARP *et al.* (eds) 1984 (q.v.).

ZIMMERMAN, R.H.; BROOME, O.C. 1980. Micropropagation of thornless black-berry. p.23-26 *in* Anon 1980 (q.v.).

ZIMMERMAN, R.H. & BROOME O.C. 1981. Phloroglucinol and *in vitro* rooting of apple cultivar cuttings. J. Am. Soc. Hort. Sci., v.106, p.648-652.

**Anexo:**

# **Anexo I : Meio Murashige e Skoog (1962)**

## **COMPOSIÇÃO DAS SOLUÇÕES-ESTOQUE**

<b>Soluções estoque</b>	<b>Sais</b>	<b>Conc. final (mg/L)</b>	<b>Quantidade para preparar 1 L de meio</b>
A	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	20 ml
B	KNO <sub>3</sub>	1900	20 mL
C	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> KI Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O CoCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	6,2 170 0,83 0,25 0,025	5 mL
D	CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	440	5 mL
E	MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O MnSO <sub>4</sub> . 4H <sub>2</sub> O ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O	370 22,30 8,6 0,025	5 mL
F	FeSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O Na <sub>2</sub> EDTA	27,80 37,30	5 mL

<b>Vitaminas</b>	<b>Conc. final (mg/L)</b>	<b>Quantidade para 250 mL</b>	<b>Quantidade para preparar 1 L de meio</b>
Ácido nicotínico	0,5	12,5 mg	10 mL
Piridoxina HCl	0,5	12,5 mg	10 mL
Tiamina HCl	0,1	2,5 mg	10 mL
Glicina	2,0	50 mg	10 mL