Multidisciplinary Sciences Reports

Artigo

CULTIVO FOTOAUTOTRÓFICO E FOTOMIXOTRÓFICO DE PLANTAS *IN VITRO*: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA SOBRE O USO DA TÉCNICA E SUAS IMPLICAÇÕES NA PRODUÇÃO DE MUDAS DE ESPÉCIES ARBÓREAS

1. Lindomar Maria de Souza lindomarsouza.ufrpe@gmail.com
1. Marta Ribeiro Barbosa martaribeirobarbosa@gmail.com
1. Katarina Romênia Pinheiro Nascimento katarina.nascimento@cetene.gov.br
1. Priscila Tavares Fonseca priscila.fonseca@cetene.gov.br
1. Laureen Michelle Houllou laureen.houllou@cetene.gov.br

1 Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste

RESUMO

No cultivo *in vitro* convencional os recipientes utilizados favorecem e caracterizam um ambiente interno de alta umidade, baixa concentração de CO_2 e acúmulo de etileno. Essas características podem alterar os aspectos os morfoanatômicos, bioquímicos e fisiológicos dos propágulos cultivados, podendo resultar em células com cutículas finas, estômatos não funcionais e sistema fotossintético pouco desenvolvido, comprometendo a produção das mudas, gerando perdas, especialmente durante a aclimatização. Ademais, esse tipo de cultivo é responsável pelos altos custos provenientes das técnicas de produção de mudas *in vitro*. Considerando uma das técnicas utilizadas no cultivo *in vitro* de plantas, o fotoautotrofismo, é uma tecnologia bastante promissora, o que tem despertado o interesse de muitos grupos de pesquisa, pois permite trocas gasosas entre o ambiente externo e o microambiente *in vitro*, sendo desejável sua aplicação para o maior número de espécies possíveis. Esta revisão faz um resgate dos conhecimentos científicos que embasam os fundamentos da técnica, trazendo um compilado de trabalhos que obtiveram sucesso com o uso da técnica na produção de mudas de espécies arbóreas. Foram selecionadas publicações de acordo com a ordem de relevância sobre o uso da técnica do fotoautotrofismo. As informações compiladas nesta revisão auxiliam no desenvolvimento de novas pesquisas no âmbito do cultivo *in vitro* de plantas, trazendo importantes reflexões sobre o uso dessa técnica na produção de mudas de espécies arbóreas em larga escala considerando as particularidades de diferentes espécies.

PALAVRAS-CHAVE: Cultivo *in vitro*. Sacarose. LEDs. Trocas gasosas. Aclimatação.

Mult. Sci. Rep. 2023; v. 3 n. 3 / ISSN: **2764-0388**
DOI: https://doi.org/10.54038/ms.v3i3.42
Submetido: 18 Maio 2023 – Aceito: 04 Julho 2023

ABSTRACT
In conventional in vitro cultivation, the containers used favor and characterize an internal environment of high humidity, low concentration of CO2 and accumulation of ethylene. These characteristics can alter the morphoanatomical, biochemical and physiological aspects of the cultivated propagules, which may result in cells with thin cuticles, non-functional stomata and an underdeveloped photosynthetic system, compromising the production of seedlings, generating losses, especially during acclimatization. Furthermore, this type of cultivation is responsible for the high costs arising from in vitro seedling production techniques. Considering one of the techniques used in the in vitro cultivation of plants, photoautotrophism, is a very promising technology, which has aroused the interest of many research groups, as it allows gas exchange between the external environment and the in vitro microenvironment, and its desirable application to as many species as possible. This review recovers the scientific knowledge that underlies the fundamentals of the technique, bringing a compilation of works that were successful with the use of the technique in the production of seedlings of tree species. Publications were selected according to the order of relevance on the use of the photoautotrophism technique. The information compiled in this review helps in the development of new research in the field of in vitro plant cultivation, bringing important reflections on the use of this technique in the production of seedlings of tree species on a large scale, considering the particularities of different species.

KEYWORDS: *In vitro* culture. Sucrose. LEDs. Gas exchange. Acclimatization.

INTRODUÇÃO

Muito se fala sobre as técnicas de cultivo *in vitro* de plantas como ferramentas promissoras na produção de mudas de diversas espécies, seja no âmbito ambiental ou comercial. A produção de mudas de espécies raras ou ameaçadas, arbóreas, medicinais, cultivares, com qualidade, livre de patógenos e doenças e produção em larga escala são alguns dos pilares básicos para quem decide trabalhar com o cultivo *in vitro* de plantas (28).

O cultivo *in vitro* de plantas é obtido utilizando em sua grande maioria dos protocolos, meios de cultura contendo macro e micronutrientes, vitaminas, fonte de carbono (geralmente sacarose) e dependendo da espécie um agente gelificante, que após preparado são dispensados em recipientes fechados, asséptico e mantidos em ambiente controlado. Algumas espécies apresentam respostas mais adaptativas a determinados tipos de meio de cultura (formulações, consistências, etc.), ou a um tipo de iluminação e fotoperíodo específico. Sendo assim e considerando a vastidão das modificações e ajustes dos componentes físicos e químicos do microambiente no cultivo *in vitro* de plantas, quais parâmetros podem ser considerados preditores da melhor técnica? Será que limitar-se a apenas uma técnica durante o ciclo propagativo de uma espécie *in vitro* é a melhor escolha?

A gama de pesquisas científicas que testam diferentes métodos para avaliar o desempenho de uma determinada espécie cultivada *in vitro* é bem vasta. Dentre esses, estão as modificações no meio de cultura para melhorar a resposta fisiológica, concentrações de sais inorgânicos, vitaminas, fontes de carbono e de substâncias, bem como, o uso de diferentes tipos de meio de cultura, emprego de diodos emissores de luz (LEDs) modulando a respostas morfofisiológicas, biorreatores aumentado a eficiência do processo e cultivo fotoautotrófico e fotomixotrófico visando um aparelho fotossintético mais eficiente (2, 28).

O fotoautotrofismo é uma técnica de cultivo *in vitro* de plantas bastante promissora, o que tem despertado o interesse de muitos grupos de pesquisa, pois permite as trocas gasosas entre o ambiente externo e o microambiente *in vitro*, sendo desejável sua aplicação para o maior número de espécies possíveis (1, 2, 3). Mas, o que está por trás dos mecanismos adaptativos das espécies para conseguir fazer

Mult. Sci. Rep. 2023; v. 3 n. 3 / ISSN: **2764-0388**
DOI: https://doi.org/10.54038/ms.v3i3.42
Submetido: 18 Maio 2023 – Aceito: 04 Julho 2023

melhor uso do CO_2 externo em um ambiente de espaço limitado e com reservas de nutrientes limitadas? Essas respostas podem variar de acordo com características morfoanatômicas particulares de cada espécie, tais como a espessura do mesofilo, onde está concentrada a maior potência energética quando se refere ao metabolismo primário nas plantas, ou a densidade estomática, a qual varia de acordo com a disponibilidade de CO_2 para as plantas (4, 5).

É compreensível o fascínio pelas vantagens que o uso dessa técnica permite, garantindo maior produtividade e diminuição das perdas das mudas, especialmente na etapa de aclimatização. Essa etapa é considerada uma das mais críticas para o cultivo *in vitro* de plantas, pois as mudas produzidas apresentam baixa adaptação às variações de temperatura, umidade e luminosidade do ambiente. A baixa adaptação na maioria das vezes vem acompanhada de baixíssimas taxas de sobrevivência, levando a grandes perdas financeiras no sistema de produção de mudas (6).

Entretanto, nem todas as espécies se adaptam bem ao cultivo fotoautotrófico *in vitro*, sendo necessário adaptações com redução parcial da sacarose do meio de cultura associado com membranas permeáveis de modo a permitir uma semi adaptação das estruturas celulares a se desenvolverem (13, 14). Nesses casos, o termo fotomixotrófico é utilizado, visto que a sacarose ainda está sendo fornecida aos tecidos dos propágulos, mesmo que em baixas quantidades. O próprio nome fotomixotrófico é sugestivo para a combinação de fatores que envolvem o cultivo convencional e o fotoautotrófico (4)

Esta revisão de literatura (narrativa) tem por objetivo fazer um resgate dos conhecimentos científicos que embasam os fundamentos teóricos, trazer um compilado de trabalhos que obtiveram sucesso com o uso da técnica na produção de mudas de espécies arbóreas e por fim, trazer a reflexão sobre o uso do fotoautotrofismo na produção de mudas de espécies arbóreas em larga escala considerando as particularidades de diferentes espécies.

Mult. Sci. Rep. 2023; v. 3 n. 3 / ISSN: **2764-0388**
DOI: https://doi.org/10.54038/ms.v3i3.42
Submetido: 18 Maio 2023 – Aceito: 04 Julho 2023

MATERIAL E MÉTODOS

Para o resgate de conhecimentos científicos que embasam os fundamentos da técnica do cultivo fotoautotrófico e fotomixotrófico de plantas *in vitro*, foi realizado um levantamento na literatura relacionado ao tema onde se buscou abranger conceitos, aplicações e perspectivas que tragam informações importantes sobre o uso da técnica.

O levantamento das informações foi realizado por meio eletrônico utilizando bases de dados científicas (*Science Direct, Google Acadêmico* e Periódicos Capes) utilizando palavras chaves relacionadas ao assunto nos idiomas inglês e português: *In vitro* culture. Sucrose. LEDs. Gas exchange. Acclimatization, *tree*. Foram consideradas informações em diversos tipos de publicações incluindo artigos científicos, livros e capítulos de livros relacionados com o tema "cultivo fotoautotrófico e fotomixotrófico de plantas *in vitro*", em qualquer idioma, considerando sempre a ordem de importância e relevância dos estudos.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

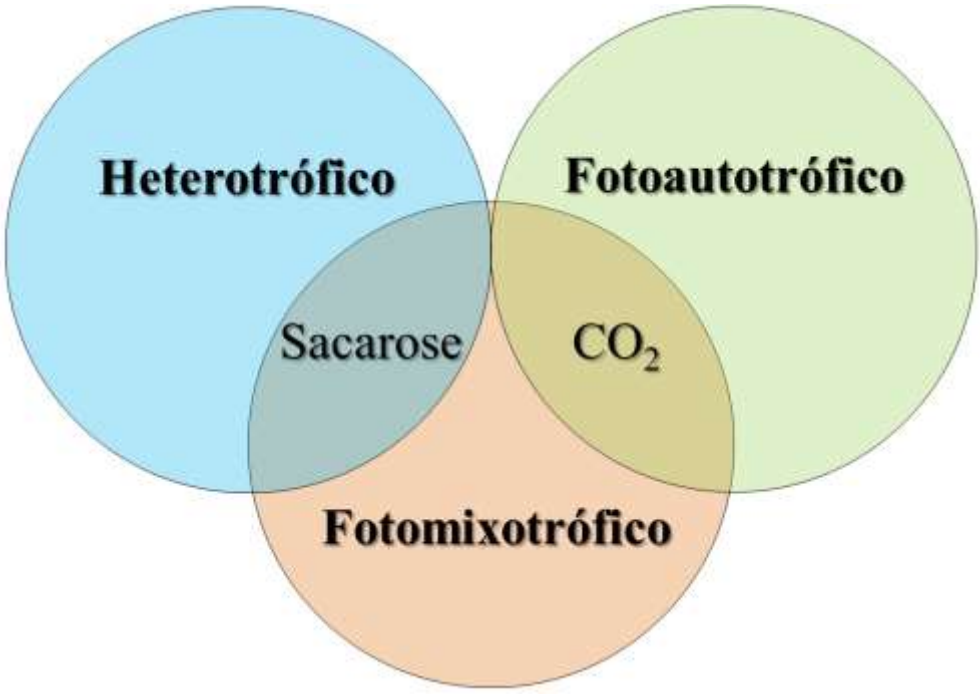
Cultivo fotoautotrófico e fotomixotrófico de plantas *in vitro*

O cultivo fotoautotrófico de plantas *in vitro* é uma ferramenta promissora e que vem sendo abordada por muitos centros de pesquisa e universidades, além de utilizadas na produção de mudas em todo o mundo. Essa técnica de cultivo tem sido considerada mais economicamente viável por diminuir os custos com insumos químicos do meio de cultura, melhorar a qualidade morfofisiológica das mudas produzidas, bem como diminuir consideravelmente as perdas durante a etapa de aclimatização (7).

No cultivo convencional ou de natureza fotomixotrófica de plantas *in vitro* os propágulos são mantidos em condições bastante artificiais: recipientes fechados, meios de cultura enriquecidos com açúcares para fornecimento do carbono necessário para o metabolismo primário, presença de luz artificial, que na maioria das vezes não supri a energia luminosa na quantidade e qualidade necessárias ao

metabolismo primário de muitas espécies (Figura 1). Além desses fatores, algumas condições não desejáveis ocorrem devido aos aspectos do cultivo convencional de plantas *in vitro*, como ausência de trocas gasosas, alta umidade relativa do ar, baixas concentrações de CO_2 e altas concentrações de etileno no microambiente do recipiente, o que leva à diminuição na síntese de carboidratos por falta de CO_2, aumento da respiração, aumento na degradação de clorofila pela liberação do etileno, além da ocorrência de distúrbios morfofisiológicos como a hiperidricidade (8, 9, 10, 11, 12).

Figura 1: Integralização entre os sistemas heterotróficos, fotoautotrófico e fotomixotrófico. Fonte: Adaptado (13).



O cultivo *in vitro* convencional é responsável pelos altos custos provenientes das técnicas de produção de mudas, uma vez que requer o consumo de sacarose para suprir a falta de CO_2, além de requerer mais tempo para o crescimento das mudas *in vitro* e promover menor desenvolvimento das estruturas das folhas responsáveis pelas trocas gasosas, fazendo com que as mudas não estejam tão preparadas para enfrentar as mudanças climáticas na aclimatização (13, 14).

Mult. Sci. Rep. 2023; v. 3 n. 3 / ISSN: **2764-0388**
DOI: https://doi.org/10.54038/ms.v3i3.42
Submetido: 18 Maio 2023 – Aceito: 04 Julho 2023

É preciso lembrar que as plantas são seres autotróficos, e tentar induzir um comportamento totalmente contrário a este, pode não dar os melhores resultados que se pode obter no desenvolvimento de novas plantas. Há muito tempo os estudos sobre fotossíntese e metabolismo do carbono trazem novidades sobre a plasticidade que as plantas têm para se adaptarem a um determinado ambiente. O cultivo *in vitro* de plantas se baseia nos princípios básicos do metabolismo vegetal, considerando a necessidade de uma fonte de energia luminosa que fornecerá literalmente a energia necessária para que as reações químicas ocorram até a formação do primeiro açúcar nos plastídios (15). O início dessa cascata de reações também conta com a participação de um elemento indispensável, o carbono, que naturalmente é obtido através do CO_2 do ar. A partir da formação do primeiro açúcar simples e da união de várias unidades deste, outros carboidratos maiores são produzidos, e estes, por sua vez, serão unidades construtoras de carboidratos mais complexos, como o amido, por exemplo. Essa é a química da vida (16).

O cultivo fotoautotrófico apresenta uma proposta mais autônoma, onde os explantes e propágulos não serão totalmente dependentes das condições artificiais. De certa maneira o ambiente continuará sendo artificial, uma vez que haverá o fornecimento de luz artificial e por vezes o CO_2 será injetado no ambiente de cultivo. Todavia, as estruturas celulares como os estômatos, bem acompanhados por suas células guarda, serão funcionais ainda no ambiente artificial ao qual lhe foi imposto (13).

A fotossíntese é limitada pela baixa concentração de CO_2 nos espaços intercelulares da folha. Quando existe uma limitação muito grande de CO_2 atmosférico, as plantas liberam CO_2 através da respiração mitocondrial. Em espécies C3, como é o caso da maioria das arbóreas, o aumento de CO_2 acima do ponto de compensação eleva a taxa fotossintética, enquanto em concentrações baixas de CO_2 o processo fotossintético é limitado devido à baixa capacidade de carboxilação da rubisco (16, 17).

Outro fator do ambiente de cultivo que desempenha um papel fundamental no crescimento dos propágulos cultivados *in vitro* é o fotoperíodo, que assim como a

Mult. Sci. Rep. 2023; v. 3 n. 3 / ISSN: **2764-0388**
DOI: https://doi.org/10.54038/ms.v3i3.42
Submetido: 18 Maio 2023 – Aceito: 04 Julho 2023

temperatura do ar pode ser modificado com maior facilidade e frequência, podendo afetar o crescimento dos propágulos (18).

A morfofisiologia das plantas cultivadas *in vitro* é influenciada por muitos fatores e entre eles está a fonte de luz. O desenvolvimento das brotações no cultivo *in vitro* também depende da qualidade e intensidade da luz, que consiste em um importante fator para o sucesso dos protocolos de micropropagação (19). Os efeitos da luz sobre os aspectos morfofisiológicos das plantas cultivadas *in vitro* dependem da densidade de fluxo de fótons fotossintéticos (FFF), que normalmente pode estar na faixa entre 30 e 60 µmol de fótons m^{-2} s^{-1}. Na natureza, a fonte de energia luminosa proveniente da luz solar abrange uma larga faixa de comprimento de onda, sendo que apenas numa pequena faixa encontra-se intimamente relacionada à ativação das reações que ocorrem nas membranas tilacoidais (400 e 700 nanômetros). Neste sentido, a luz desempenha um importante papel na ativação e regulação das reações químicas que por sua vez, irão desencadear respostas fisiológicas refletindo no crescimento e desenvolvimento das plantas (16, 20).

As baixas intensidades das fontes luminosas proveniente das condições do cultivo *in vitro* provocam alterações morfológicas e o baixo desenvolvimento de estruturas como estômatos, retardando o crescimento das plantas e dificultando a pega durante a aclimatização. Nessa etapa, as mudas obtidas do cultivo *in vitro,* precisam dos estômatos mais desenvolvidos para suportar altas incidências luminosas (13). O estresse por luminosidade também pode ocorrer durante o cultivo *in vitro,* quando a intensidade e o espectro de luz não forem adequados, podendo resultar no retardo no crescimento e desenvolvimento dos propágulos (21). No desenvolvimento de microcepas de *Eucalyptus urophylla* em sistema fotoautotrófico *in vitro*, (22) obtiveram maiores números de microestacas quando utilizaram as luzes LED vermelho distante, LED azul e fluorescente em comparação com as LED vermelho/azul, LED vermelha e LED branca.

Na etapa de aclimatização, a energia luminosa continua exercendo forte influência sobre o sucesso da propagação *in vitro*, uma vez que as plantas sofrem um estresse ocasionado pela alta intensidade da luz, considerando que a densidade e a intensidade dos fluxos fotossintéticos em ambientes de casa de vegetação são bem

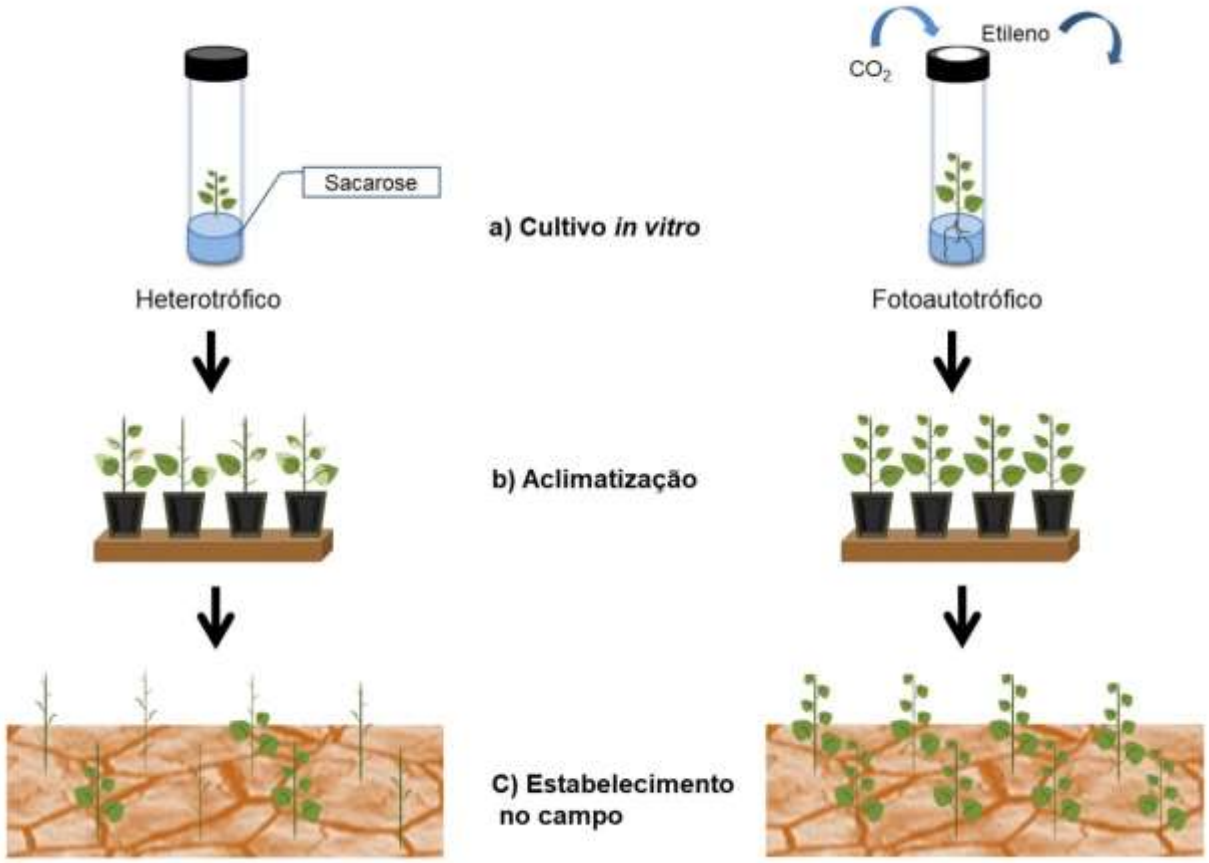
maiores que no ambiente *in vitro*. Nesse caso, as plântulas obtidas por cultivo *in vitro* precisam se adaptar rapidamente. A melhoria na qualidade da luz e redução da umidade no cultivo *in vitro* pode ajudar nessa adaptação (23, 24).

No cultivo *in vitro* convencional, na tentativa de controlar ou minimizar as perdas por contaminações das culturas, os recipientes utilizados favorecem e caracterizam um ambiente interno de alta umidade, baixa concentração de CO_2 e acúmulo de etileno (13, 25) (Figura 2). Todavia, essas características podem alterar os aspectos os morfoanatômicos, a bioquímica e a fisiologia dos propágulos cultivados, resultando em células com cutículas finas, estômatos não funcionais e sistema fotossintético pouco desenvolvido, comprometendo a produção das mudas, gerando perdas, especialmente na etapa de aclimatização (23).

No ambiente de cultivo *in vitro*, o crescimento dos propágulos depende de uma fonte externa de carbono, uma vez que os recipientes geralmente não permitem as trocas gasosas entre o interior do recipiente de cultivo e o ambiente externo.

Desse modo, comumente a fonte de carbono é suprida pelas altas concentrações de sacarose no meio de cultura. Todavia, altas concentrações de sacarose podem influenciar negativamente no crescimento e desenvolvimento morfofisiológico, anatômico e bioquímico dos propágulos (9, 26). Ademais, a sacarose é o segundo componente mais oneroso do meio de cultura para a realização das técnicas de cultivo *in vitro* de plantas, o que torna o custo da técnica muito caro para a produção em larga escala (27,28, 29). Dessa forma, a diminuição ou supressão total da sacarose do meio de cultura em associação com uma fonte de luz adequada e um recipiente que favoreça as trocas gasosas, possibilita melhor desenvolvimento dos propágulos durante o cultivo *in vitro* e seu desempenho e sobrevivência durante a etapa de aclimatização (9, 26). Além do mais, as trocas gasosas não melhoram apenas o fornecimento de CO_2, mas também, diminui o acúmulo de outros gases que podem influenciar negativamente o crescimento, como o etileno, por exemplo (11, 13).

Figura 2: Comparação entre os sistemas de cultivo heterotrófico (convencional) e fotoautotrófico e as respostas das plantas nas respectivas etapas do processo de produção de mudas *in vitro* até o estabelecimento no campo. Fonte: Adaptado (13).



A adequação da intensidade de luz e o enriquecimento de CO_2 proporcionam melhorias no crescimento e multiplicação dos propágulos, possibilitando diminuir ou suprimir completamente as concentrações de sacarose utilizadas convencionalmente no meio de cultura (30, 31). Já no cultivo fotomixotrófico, pequenas quantidades de sacarose ainda são utilizadas no meio de cultura, independente do uso de membranas microporosas e de LEDs. Um amplo número de espécies apresenta maior crescimento e desenvolvimento em condições iniciais fotomixotróficas. Enquanto muitas espécies podem apresentar melhorias no desenvolvimento com a supressão total da sacarose, outras espécies apresentam o retardo do crescimento quando esse componente é totalmente suprimido do meio de cultura (11, 19, 32).

Mult. Sci. Rep. 2023; v. 3 n. 3 / ISSN: **2764-0388**
DOI: https://doi.org/10.54038/ms.v3i3.42
Submetido: 18 Maio 2023 – Aceito: 04 Julho 2023

A manutenção da capacidade fotossintética e do teor de pigmentos fotossintetizantes em plantas cultivadas *in vitro* com a supressão de sacarose está intimamente relacionada com a capacidade de algumas espécies em melhorar seu desempenho sem o uso dessa fonte de carbono nessas condições (33,34). Neste tópico, induzimos a seguinte indagação: As respostas das plantas cultivadas *in vitro* estariam relacionadas apenas à habilidade no uso da sacarose como fonte externa de carbono ou teria relação com mecanismos fisiológicos intrínsecos da fotossíntese?

Cultivo *in vitro* de espécies arbóreas sob sistemas fotoautotrófico e fotomixotrófico: aspectos gerais na produção de mudas

A produção *in vitro* de mudas de espécies arbóreas precisa superar algumas questões, dentre elas, o controle de desordens morfofisiológicas, tais como a hiperidricidade, altas taxas de contaminação e dependendo da espécie, a formação de calos na base dos explantes (35, 36, 37). Outro processo comum de se observar são as altas taxas de oxidação, que, por se tratar de plantas lenhosas, há uma abundância de compostos fenólicos, principalmente os percussores das ligninas, os quais interagem com outros compostos em diversas reações químicas, liberando exsudados no meio de cultura, interferindo na absorção dos nutrientes do meio de cultura (38, 39).

No caso da hiperidricidade, esta desordem morfofisiológica é consequência do fechamento do recipiente no cultivo *in vitro* de plantas, o que dificulta as trocas gasosas, resultando em alta umidade no interior dos recipientes de cultivo. Com o cultivo em sistema fotoautotrófico a possibilidade de trocas gasosas, além de reduzir a umidade relativa interna, estimula as trocas gasosas e a liberação do etileno para o exterior do frasco. Esses adventos vêm acompanhados do favorecimento da formação de estruturas morfofisiológicas como, cutícula, estômatos e o bom desenvolvimento de tecidos do mesofilo, melhorando a fotossíntese e a respiração das plantas (10, 40, 41).

A produção de mudas de algumas espécies pode ser potencialmente melhorada quando é realizado o cultivo em recipientes com ventilação e fotoperíodo adequados. Entretanto, quando é adicionado um pequeno percentual de sacarose no meio de cultura, alterando o sistema fotoautotrófico para o fotomixotrófico, é observado um aumento significativo nos teores de pigmentos fotossintéticos, o que torna essas espécies potencialmente mais fortes aos fatores abióticos durante a aclimatização. A propagação de algumas espécies arbóreas pode ser realizada com a supressão total da sacarose, entretanto, o número e o tamanho das brotações, o número de folhas e o desenvolvimento radicular são variáveis e extremamente influenciáveis pela adição ou supressão da sacarose no meio de cultura, o que pode interferir negativamente na economia e em perdas na produção de mudas (30).

Por esse motivo, o cultivo fotomixotrófico tem se mostrado uma excelente opção para adequar as condições de cultivo de modo a melhorar a qualidade morfofisiológica e bioquímica das brotações, aumentando as chances de sucesso durante a aclimatização na produção *in vitro* de mudas.

Dependendo da espécie em questão, algumas pesquisas irão apontar para a diminuição ou supressão dos teores de sacarose como um estimulador do processo fotossintético (42). Todavia, as limitações de crescimento e desenvolvimento de brotações de espécies arbóreas em meio com supressão parcial ou total de sacarose, pode em alguns casos, ser utilizado como uma alternativa promissora na conservação de brotações por curtos períodos, apesar de ir de encontro com vários protocolos que sugerem a adição de grandes quantidades desse e de outros solutos na diminuição e manutenção do metabolismo vegetal, com vistas à conservação (19). O baixo crescimento e desenvolvimento das brotações nessas condições pode indicar uma baixa competência na utilização do carbono externo para realizar a fotossíntese, que em alguns casos pode ou não estar atrelado ao fornecimento inadequado de energia luminosa ou suprimento de CO_2 (43).

Uma importante associação positiva entre a adição de sacarose no meio de cultura e o estresse oxidativo foi realizada, o que também pode justificar em parte a melhoria da qualidade fisiológica das mudas produzidas (30).

Um dos sistemas que pode favorecer as trocas gasosas durante micropropagação de plantas é de biorreatores de imersão temporária (44). A sugestão de cultivo de espécies arbóreas em biorreatores tem se mostrado favorável, uma vez que promove a renovação do ar dentro do recipiente de cultivo, além de maior disponibilidade de nutrientes aos tecidos dos propágulos, acelerando o crescimento (30, 45, 46,47,48).

O sucesso de um protocolo de propagação *in vitro* está na adequação de cada espécie e das fases de cultivo. Por exemplo, o ajuste do protocolo de propagação para Teca, intercalado entre meio semi-sólido e líquido com o uso de biorreatores em diferentes fases foi um ponto crucial para o sucesso do protocolo de propagação em biorreator dessa espécie (49).

A propagação de *Salix viminalis* L. foi realizada com sucesso com o uso de biorreatores, independente do uso ou não da sacarose, por se tratar de um sistema automatizado que favorece a circulação e a troca de ar entre o recipiente de cultivo e o ambiente externo, além de ser um facilitador da entrada de CO_2 para a fotossíntese (50). Neste sentido, (51), já haviam relacionado maiores crescimento das brotações e taxa de multiplicação em *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla,* com as trocas gasosas presentes no cultivo em sistema biorreator de imersão temporária. A otimização do crescimento dos propágulos observado em sistemas de imersão temporária além de ser influenciado pelas trocas gasosas, também é favorecido pela maior disponibilidade de nutrientes no meio líquido em detrimento do meio semi-sólido (52).

No caso da propagação por sementes, a quebra e a mobilização das reservas armazenadas no cultivo fotoautotrófico, é a principal fonte de carbono e energia para o estabelecimento das plântulas (19). A germinação de sementes de espécies arbóreas pode ser realizada sem a presença de sacarose, já que a ausência do composto favorece quantidade de água livre para as reações bioquímicas, aumentando a velocidade de germinação. Essa condição também contribui para a diminuição das taxas de contaminação que, normalmente são bem críticas no início dos cultivos. Assim, no início do cultivo *in vitro* de espécies arbóreas, quando se utiliza sementes como explantes primários provenientes de uma planta matriz do campo, o

emprego de sistemas de cultivo fotoautotrófico sem a presença de sacarose pode ser bem promissor (53).

A supressão total de sacarose em associação com membranas microporosas promoveu o crescimento e desenvolvimento de plantas de *Myracrodruon urundeuva*, as quais apresentaram características morfofisiológicas superiores àquelas cultivadas na presença da sacarose (28).

Embora os cultivos fotoautotrófico e fotomixotrófico sejam técnicas amplamente utilizadas nas pesquisas de cultivo *in vitro* de plantas, ainda é bastante desafiador o emprego destas no estabelecimento e propagação *in vitro* de espécies arbóreas. Apesar de ainda serem poucos os trabalhos, o uso dessas técnicas em pesquisas com espécies arbóreas deve ser encorajado, visto que além da obtenção de mudas com melhor qualidade morfofisiológica com diminuição de perdas na aclimatização, pode baratear a produção de mudas nas biofábricas, diminuindo os custos finais na produção de mudas para reflorestamento, o que impacta diretamente nas ações de recuperação de biomas.

Compreender a dinâmica metabólica de cada espécie e a maneira que elas fazem o uso do carbono externo, seja ele proveniente da sacarose ou do CO_2 do ambiente é essencial para se obter sucesso nos protocolos de propagação (12, 34).

CONCLUSÃO

A propagação de plantas *in vitro* é considerada por alguns autores como uma técnica inicialmente onerosa, quando comparada com os outros métodos de propagação. Todavia, essa tecnologia veio para revolucionar a escala produtiva de mudas em diversos âmbitos. Dependendo dos objetivos e da espécie, sem dúvida, o cultivo *in vitro* de plantas é o mais economicamente viável, especialmente pela quantidade de mudas que é produzida em um curto espaço de tempo e em um ambiente relativamente pequeno. Além da manutenção da produção ao longo do ano independente da sazonalidade, as condições assépticas que proporcionam redução de contaminações, pouca necessidade de mão e obra e atividades inerentes ao cultivo convencional que necessita de atividade como regas, capinam e pulverizações de agentes antimicrobianos.

Mult. Sci. Rep. 2023; v. 3 n. 3 / ISSN: **2764-0388**
DOI: https://doi.org/10.54038/ms.v3i3.42
Submetido: 18 Maio 2023 – Aceito: 04 Julho 2023

Desse modo, além do uso das técnicas de cultivo *in vitro* tradicional ser bem empregadas na micropropagação de mudas, a utilização de sistemas fotoautotrófico e fotomixotrófico demonstra-se ainda mais vantajosa, por melhorarem a qualidade morfofisiológica das plantas, promoverem a diminuição de perdas durante a produção de mudas, além de possibilitarem a diminuição no consumo de insumos do meio de cultura.

REFERÊNCIAS

1. DE Paula Alves J, Pinheiro MVM, Corrêa TR, Alves GL, Marinho TRS, Batista DS et al. Morfofisiologia de *Ananas comosus* durante o crescimento fotomixotrófico *in vitro* e aclimatação *ex vitro*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant* 2022. 1-15.
2. Kozai T. Photoautotrophic micropropagation - environmental control for promoting photosynthesis. *Propagation of Ornamental Plants,* 2010. 10: 188–204.
3. Kozai T. Micropropagation under photoautotrophic conditions. In: Debergh PC, Zimmerman TH organizadores. Micropropagtion tecnology and application. Kluwer Academic Publishers, 1991. p. 447–469.
4. Evans JR. Mesophyll conductance: walls, membranes and spatial complexity. *New Phytologist* 2020. 229: 1864 –1876.
5. Winter K, Garcia M, Holtum JAM. Canopy CO_2 exchange of two neotropical tree species exhibiting constitutive and facultative CAM photosynthesis, *Clusia rosea* and *Clusia cylindrica*. *Journal of Experimental Botany* 2009. 60 (11): 3167–3177.
6. Zhou J, Guo F, Qi C, Fu J, Xiao Y, Wu J. Optimizing Photoautotrophic Micropropagation Conditions for Ginger. *Research Square* 2022. p. 1-12.
7. Santana JRF, Paiva R, Resende RKS, Castro EM, Pereira FD, Oliveira LM. Estímulo do comportamento fotoautotrófico durante o enraizamento *in vitro* de *Annona glabra* L., II. Aspectos da anatomia da folha antes da aclimatização. *Ciência e Agrotecnologia* 2008. 32 (2): 640-644.

Mult. Sci. Rep. 2023; v. 3 n. 3 / ISSN: **2764-0388**
DOI: https://doi.org/10.54038/ms.v3i3.42
Submetido: 18 Maio 2023 – Aceito: 04 Julho 2023

8. Erig AC, Schuch MW. Micropropagação fotoautotrófica e uso da luz natural. *Ciência Rural* 2005. 35 (4): 961-965.
9. Martins JPR, Pasqual M, Martins AD, Ribeira SF. Effects of salts and sucrose concentrations on in vitro propagation of *Billbergia zebrina* (Herbert) Lindley (Bromeliaceae). *Australian Journal of Crop Science* 2015. 9: 85-91.
10. Souza LM, Barbosa MR, Zarate-Salazar JR, Lozano-Isla F, Camara TR. Use of meta-Topolin, an unconventional cytokinin in the *in vitro* multiplication of *Opuntia stricta* Haw. *Biotecnología Vegetal* 2019. 19: 85-96.
11. Santos GC, Cardoso FP, Martins AD, Pasqua M, Ossani PC, Queiroz RJM et al. Effect of light and sucrose on photoautotrophic and photomixotrophic micropropagation of *Physalis angulata*. *Biosci. J.* 2020. 36 (4): 1353-1367.
12. Silva KB, Reiniger LRS, Rabaiolli SMS, Ziegler ACF, Stefanel CM. Efeito de diferentes períodos de cultivo na micropropagação de brotações de *Luehea divaricata*. *Pesquisa Florestal Brasileira* 2021. 41(e201901921): 1-6.
13. Ashrafzadeh S, Leung DWM. Photoautotrophic micropropagation system (PAM): A novel approach deserving increased uptake for commercial plant production. *Vegetos* 2021. 34 (1): 13-18.
14. Martins JPR, Verdoodt V, Pasqual M, DE Proft M. Impacts of photoautotrophic and photomixotrophic conditions on *in vitro* propagated *Billbergia zebrina* (Bromeliaceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 2015. 123: 121–132.
15. Chandran H, Meena M, Barupal T, Sharma K. Plant tissue culture as a perpetual source for production of industrially important bioactive compounds. *Biotechnology Reports* 2020. 26 (450): p. 1-10.
16. Taiz L, Zeiger E, Møller IM, Murphy A. Fisiologia e desenvolvimento vegetal. 6 ed. Porto Alegre: ARTMED, 2017. 857 p.
17. Abdelhakim LOA, Zhou R, Ottosen C. Physiological Responses of Plants to Combined Drought and Heat under Elevated CO_2. *Agronomy* 2022. 12 (2526): 1-12.
18. Duyen NTP, Van TT, Minh NLT, Quynh NT. Effects of micro-environmental factors on the photoautotrophic growth of *Hibiscus sagittifolius*. *Tap Chi Sinh Hoc* 2017. 39 (4): 496-506.

Mult. Sci. Rep. 2023; v. 3 n. 3 / ISSN: **2764-0388**
DOI: https://doi.org/10.54038/ms.v3i3.42
Submetido: 18 Maio 2023 – Aceito: 04 Julho 2023

19. Carvalho MJS, Souza AS, Santos EB, Soares-filho WS, Ledo CAS, Costa EMR, Souza FVD. *In vitro* conservation of 'Florida Rough' lemon plants. *Ciência Rural* 2022. 52 (12): 1-9.
20. Silveira AAC, Lopes FJF, Sibov ST. Micropropagation of *Bambusa oldhamii* Munro in heterotrophic, mixotrophic and photomixotrophic systems. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* (PCTOC) 2020. 141: 315-326.
21. Yen H, Liou S, Hsieh Y. Tissue culture of *Anaoectochilus Formonasus* Hayata by combining fluorescent lamp R-LEDs as light source. 2011, Conference on Industrial Electronics and Applications. 312-315.
22. Miranda NA, Xavier A, Otoni WC, Gallo R, Gatti KC, Moura, LC et al. Quality and intensity of light in the in vitro development of microstumps of *Eucalyptus urophylla* in a photoautotrophic system. *Forest Science* 2020. 66 (6): 754–760.
23. Krisantini NMAW. Photoautotrophic system: A review and potential applications in plant micro propagation. *Journal of Tropical Crop Science* 2018. 5 (2): 73-77.
24. Silva AB, Pasqual M, Castro EM, Miyata LY, Melo LA, Braga FT. Luz natural na micropropagação do abacaxizeiro. *Interciencia* 2008, 33 (11): 839-843.
25. Xiao Y, Niu G, Kozai T. Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 2011. 105:149-158.
26. Lembrechts AR, Ceustersb N, Profta MP, Ceustersb J. Sugar and starch dynamics in the medium-root-leaf system indicate possibilities to optimize plant tissue culture. *Scientia Horticulturae* 2017. 224: 226–23.
27. Nguyen QT, Kozai T. Photoautotrophic micropropagation of woody species. In: Kozai T, Afreen F, Zobayed SMA, organizadores. Photoautotrophic (sugar-free medium) micropropagation as a new propagation and transplant production system. Dodrecht: SPRINGER, 2005. 316p.
28. Souza LM, Barbosa M. R, Souza RA, Nascimento TMMP, Houllou LM. Morphoanatomical and biochemical responses of *Myracrodruon urundeuva* under photomyxotrophic culture, a native species with priority for local conservation. *International Journal of Botany Studies* 2020. 5 (3): 387-397.

Mult. Sci. Rep. 2023; v. 3 n. 3 / ISSN: **2764-0388**
DOI: https://doi.org/10.54038/ms.v3i3.42
Submetido: 18 Maio 2023 – Aceito: 04 Julho 2023

29. Arencibia AD, Gómez A, Poblete MA, Orellana F, Alarcón JE, Cortez N, Valenzuela MA. Establishment of photomixotrophic cultures for high-scale micropropagation by temporary immersion bioreactors (TIBs) in plant commercial species. *Acta Horticulturae* 2018. 1224: 203–208.
30. Gago D, Bernal MÁ, Sánchez C, Aldrey A, Cuenca B, Christie CB, Vidal N. Effect of sucrose on growth and stress status of *Castanea sativa* x *C. crenata* shoots cultured in liquid medium. *Plants* 2022. 11 (965): 1-18.
31. Shin KS, Murthy HN, Heo JW, Hahn EJ, Paek KY. The effect of light quality on the growth and development of in vitro cultured *Doritaenopsis* plants. *Acta Physiol Plant* 2008. 30: 339–343.
32. Macedo AF, Costa MVL, Tavares ES, Lage CLS, Esquibel MA. The effect of light quality on leaf production and development of in vitro-cultured plants of *Alternanthera brasiliana* Kuntze. *Environmental and Experimental Botany* 2011. 70: 43–50.
33. Souza LM, Barbosa MR, Souza RA, Bussmeyer EC, Houllou LM. Influência da sacarose no crescimento e no perfil de pigmentos fotossintéticos em duas espécies arbóreas cultivadas *in vitro*. *Brazilian Journal of Development* 2020. 6 (1): 1916-1926.
34. Silva TD, Chagas K, Batista DS, Felipe SHS, Louback E, Machado LT et al. Morphophysiological *in vitro* performance of Brazilian Ginseng (*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen) based on culture medium formulations. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant* 2019. 55 (4): 454-467.
35. Hazarika BN. Morpho-phisiological disorders in *in vitro* culture of plants. *Scientia Horticulturae* 2006. 108:105-120.
36. Oliveira LS, Dias PC, Brondani GE. Micropropagação de espécies florestais brasileiras. *Pesquisa florestal brasileira* 2013. 33 (76): 439-453.
37. Souza LM, Barbosa MR, Palhares Neto L, Ulisses C. Produção de mudas de *Myracrodruon urundeuva* Allemão via micropropagação: uma alternativa para conservação da espécie. In: Sousa CM, Costa CJS, Silva EH, Lima RA, organizadores. Produção científica e alternativas para o Meio Ambiente: Diálogos. 21 ed. Campina Grande: REALIZE, 2020. p. 49-65.

Mult. Sci. Rep. 2023; v. 3 n. 3 / ISSN: **2764-0388**
DOI: https://doi.org/10.54038/ms.v3i3.42
Submetido: 18 Maio 2023 – Aceito: 04 Julho 2023

38. DE Deus DA, Zaú AS, Muniz GIB, Nisgoski S, Abreu HS, Gama DC. Lignina: uma importante tecnologia química da madeira. *e-Acadêmica* 2022. 3 (3): e7233391.
39. Oliveira NP, Ribeiro SAP, Souza MM. Controle de contaminação e oxidação no cultivo *in vitro* de oliveira (*Olea europaea* L.) cv. "Koroneiki". Research. *Society and Development* 2021. 10 (5): e30710514929.
40. Nunes NSP, Ansilago M, Carvalho EM. Uso da micropropagação para prospecção de espécies endêmicas do Cerrado. In: Silva CDD, santos DB. A Estruturação e reconhecimento das ciências biológicas na contemporaneidade. Ponta Grossa - PR: ATENA, 2021. p. 17-38.
41. Vasconcelos AGV, Tomas LF, Camara TR, Willadino L. Hiperidricidade: uma desordem metabólica. *Ciência Rural* 2012. 42 (5): 837-844.
42. Ševčíková H, Lhotáková Z, Hamet J, Lipavská H. Mixotrophic in vitro cultivations: the way to go astray in plant physiology. *Physiologia Plantarum* 2018.167: 365-377.
43. Cardoso MN, Araujo AG, Silva AVC, Oliveira LAR, Lédo AS. Influência de luz e sacarose no crescimento *in vitro* de mandioca. *Nucleus* 2018. 15 (1): 85-92.
44. Ribeiro JM, Bastos DC. Biorreatores: aspectos gerais e sua utilização para cultura de tecidos vegetais. Documentos, 2008. Petrolina: EMBRAPA SEMIÁRIDO INFOTECA-E, 26 p.
45. García-ramírez Y, Temporary immersion system for in vitro propagation via organogenesis of forest plant species. *Tree* 2023. 291: 1-16.
46. Mcalister B, Finnie J, Watt MP, Blakeway F. Use of the temporary immersion bioreactor system (RITA®) for production of commercial *Eucalyptus* clones in Mondi Forests (SA). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 2005. 81 (3): 347–358.
47. Quiala E, Cañal MJ, Meijón M, Rodríguez R, Chávez M, Valledor L et al. Morphological and physiological responses of proliferating shoots of teak to temporary immersion and BA treatments. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 2012. 109: 223–234.

Mult. Sci. Rep. 2023; v. 3 n. 3 / ISSN: **2764-0388**
DOI: https://doi.org/10.54038/ms.v3i3.42
Submetido: 18 Maio 2023 – Aceito: 04 Julho 2023

48. Murch SJ, Liu C, Romero RM, Saxena PK. *In vitro* culture and temporary immersion bioreactor production of *Crescentia cujete*. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 2004. 78: 63–68.
49. Aguilar ME, Garita K, Kim YW, Kim J, Moon HK. Simple protocol for the micropropagation of Teak (*Tectona grandis* Linn.) in semi-solid and liquid media in RITA® bioreactors and ex vitro rooting. *American Journal of Plant Sciences* 2019. 10: 1121-1141.
50. Gago D, Vilavert S, Bernal MÁ, Sánchez C, Aldrey A, Vidal N. The Effect of sucrose supplementation on the micropropagation of *Salix viminalis* L. shoots in semisolid medium and temporary immersion bioreactors. *Forests* 2021. 12 (1408): 1-15.
51. Oliveira ML, Xavier A, Penchel RM, Santos AF. Multiplicação in vitro de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* cultivado em meio semissólido e em biorreator de imersão temporária. *Scientia Forestalis* 2011. 39 (91): 309-315.
52. Godoy S, Tapia E, Seit P, Andrade D, Sánchez E, Andrade P et al. Temporary immersion systems for the mass propagation of sweet cherry cultivars and cherry rootstocks: development of a micropropagation procedure and effect of culture conditions on plant quality. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant* 2017. 1-11.
53. Barbosa MR, Souza LM, Souza RA, Houllou LM. Aspectos do estabelecimento in vitro de *Handroanthus chrysotrichus* (Bignoniaceae) para a produção de mudas. *Brazilian Journal of Development* 2020. 6: 2830-2840.

Mult. Sci. Rep. 2023; v. 3 n. 3 / ISSN: **2764-0388**
DOI: https://doi.org/10.54038/ms.v3i3.42
Submetido: 18 Maio 2023 – Aceito: 04 Julho 2023