

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Desenvolvimento Tecnológico
Curso de Graduação em Biotecnologia



TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Micropropagação e produção de sementes sintéticas de amoreira-preta

Camila Müller Dallmann

Pelotas, 2016.

Camila Müller Dallmann

Micropropagação e produção de sementes sintéticas de amoreira-preta

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador Acadêmico: Prof. Dra. Ana Lúcia Soares Chaves

Orientador de estágio: Prof. Dr. Leonardo Ferreira Dutra

Pelotas, 2016.

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas Catalogação na Publicação

D144m Dallmann, Camila Müller

Micropropagação e produção de sementes sintéticas de amoreira-preta / Camila Müller Dallmann ; Ana Lúcia Soares Chaves, orientadora ; Leonardo Ferreira Dutra, coorientador. — Pelotas, 2016.

41 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) — Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, 2016.

1. Propagação in vitro. 2. Rubus spp. 3. Encapsulamento. I. Chaves, Ana Lúcia Soares, orient. II. Dutra, Leonardo Ferreira, coorient. III. Título.

CDD : 634.713

Elaborada por Ubirajara Buddin Cruz CRB: 10/901

Camila Müller Dallmann

Micropropagação e produção de sementes sintéticas de amoreira-preta

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado, como requisito parcial, para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia, Curso de Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da apresentação: 13 de dezembro de 2016

Banca examinadora:

Ph. D. em Bioquímica e Biologia Molecular de Plantas - Ana Lúcia Soares Chaves (Orientador)

Dr. em Ciências - Paulo Celso de Mello Farias

M. Sc. em Engenharia Química - Juliana Hey Coradin

AGRADECIMENTOS

Dedico este trabalho, primeiramente, a Deus, pela proteção e por guiar meus caminhos em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais Sidnei e Noeli, ao meu irmão Moisés e à minha tia Arlete pelo amor, carinho e compreensão em todos os momentos que necessitei. Pelo incentivo e apoio aos meus sonhos. E, à minha cunhada Ligia pela amizade e ajuda.

À minha querida orientadora acadêmica, professora Ana Lúcia Soares Chaves, pela dedicação, carinho e ensinamentos que tornaram minha experiência na faculdade muito especial.

Ao meu orientador de estágio, Dr. Leonardo Ferreira Dutra, pela oportunidade de estágio na Embrapa Sede, e também, por todos os ensinamentos transmitidos.

A todos do laboratório da Embrapa de Cultura de Tecidos, em especial à Juliana, pela paciência, dedicação e orientação durante minhas atividades de estágio, à Rafaela, Letícia e Gustavo pela ajuda e, também, pelos ensinamentos do Nino.

Aos colegas do Laboratório de Metabolismo Secundário, do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial (DCTA) da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, pelos ensinamentos durante minhas atividades.

Aos professores da Graduação de Biotecnologia, por todo o aprendizado.

Às minhas queridas amigas Maiara e Martina pela amizade.

Aos meus colegas do curso de Biotecnologia.

Agradeço, também, a todos aqueles que de alguma forma contribuíram e acompanharam a minha trajetória até aqui.

Muito obrigada!

NOTAS PRELIMINARES

O presente trabalho de conclusão de curso foi redigido segundo o Manual de Normas para Dissertações, Teses e Trabalhos Científicos da Universidade Federal de Pelotas de 2013, adotando o Nível de Descrição 2 – estruturas em capítulos.

Disponível no endereço eletrônico: (<http://sisbi.ufpel.edu.br/?p=manual>)

*“Dificuldades preparam pessoas comuns para destinos
extraordinários”.*

(C. S. Lewis)

Resumo

DALLMANN, Camila Müller. **Micropropagação e produção de sementes sintéticas de amoreira-preta**. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso de Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

Os recursos naturais existentes são um patrimônio que necessita ser estudado e, acima de tudo, protegido. Com este intuito, a aplicação de técnicas de cultura de tecidos é imprescindível para evitar a extinção de espécies de interesse a fim de garantir, também, a manutenção da qualidade genética e fitossanitária. A cultura de tecidos vegetais é uma tecnologia a qual auxilia na propagação de plantas de interesse econômico de fácil ou de difícil cultivo em curtos períodos de tempo, na produção de plantas ornamentais, na recuperação de espécies atingidas por agentes causadores de doenças, na manutenção de bancos de germoplasma in vitro e na transformação genética. Dentre as espécies de interesse, destacam-se pequenas frutas as quais são cada vez mais exploradas por sua importância nutricional em função da sua composição bioquímica. Com isso, produtores interessados em novas alternativas para cultivo e pelo novo perfil do próprio consumidor, preocupado cada vez mais com sua saúde, vem demonstrando que as espécies classificadas neste grupo precisam ser melhor exploradas já que se necessita aprofundar os conhecimentos sobre seus benefícios. A área cultivada no Rio Grande do Sul e consumo vem ganhando cada vez mais ênfase. Baseado nisso, espécies como a amoreira-preta apresentam grande potencial econômico em relação ao seu fácil desenvolvimento e apreciação do público. A amora-preta é um fruto saboroso que torna a sobremesa requintada, sendo uma das espécies frutíferas considerada de fácil cultivo e que apresenta propriedades nutricionais em virtude aos compostos presentes, tais como antocianinas e flavonoides. Esses compostos estão relacionados com a atividade antioxidante a qual auxilia na prevenção de doenças degenerativas e cardiovasculares, e alguns tipos de câncer. Então, a importância de utilizá-la na cultura de tecidos vegetais para auxiliar em um maior entendimento de seu desenvolvimento e obter resultados mais promissores da produção resultante do seu cultivo. A partir deste contexto, com o intuito de produzir plantas de qualidade, as sementes sintéticas auxiliam na multiplicação de espécies de vegetais de complicada propagação, na proteção e na resistência do propágulo, otimizando o tempo e diminuindo custos de produção de mudas.

Palavras-chave: Propagação in vitro; *Rubus* spp; encapsulamento.

Abstract

DALLMANN, Camila Müller. **Micropropagation and production of syntetics seeds of blackberry**. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso de Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

The existing natural resources are an asset that needs to be studied and, above all, protected. To this end, application of tissue culture techniques is essential to prevent the extinction of species of interest in order to ensure, also, the maintenance of genetic and phytosanitary quality. The plant tissue culture is a technology that helps in the propagation of plants of economic interest of easy or difficult to cultivate in short periods of time, in the production of ornamental plants, in the recovery of species affected by agents causing diseases, in the maintenance of Germplasm banks and genetic transformation. Among the species of interest, small fruits stand out which are increasingly exploited for their nutritional importance due to their biochemical composition. Thus, producers interested in new alternatives for cultivation and the new profile of the consumer, increasingly concerned about their health, has demonstrated that the species classified in this group need to be better explored since it is necessary to deepen the knowledge about its benefits. The area cultivated in Rio Grande do Sul and consumption has been gaining more and more emphasis. Based on this, species such as blackberry have great economic potential in relation to their easy development and appreciation of the public. The blackberry is a tasty fruit that makes the dessert exquisite, being one of the fruit species considered of easy cultivation and that presents / displays nutritional properties by virtue of the present compounds, such as anthocyaninas and flavonoids. These compounds are related to the antioxidant activity which helps in the prevention of degenerative and cardiovascular diseases, and some types of cancer. Therefore, the importance of using it in plant tissue culture to aid in a better understanding of its development and to obtain more promising results of the production resulting from its cultivation. From this context, in order to produce quality plants, the synthetic seeds help in the multiplication of species of plants of complicated propagation, in the protection and the resistance of the propagule, optimizing the time and reducing costs of production of seedlings.

Key-words: In vitro Propagation; *Rubus* spp; encapsulation.

Lista de Figuras

Figura 1	Diagrama das etapas do encapsulamento de gemas de amoreira-preta.....	26
Figura 2	Subcultivo cultivares Comanche/Ébano (da esquerda para a direita).....	28
Figura 3	Cultivares multiplicadas (da esquerda para à direita) Caingangue, Comanche, Ébano, Guarani, Tupy e Xavante.....	28
Figura 4	Preparo para a aclimatização de seleções de amoreira-preta....	29
Figura 5	Início da aclimatização de seleções de amoreira-preta.....	29
Figura 6	Cobertura das plantas submetidas à aclimatização.....	29
Figura 7	Mudas desenvolvidas.....	30
Figura 8	Sementes sintéticas após lavagem com água deionizada.....	31
Figura 9	Sementes sintéticas apresentando oxidação.....	31
Figura 10	Sementes sintéticas in vitro com presença de contaminação microbiana.....	31
Figura 11	Sementes sintéticas.....	32

Lista de abreviaturas e siglas

BAP	6 - Benzilaminopurina
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
KNO ₃	Nitrato de potássio
MS	Meio MURASHIGE, SKOOG (1962)
ZEA	Zeatina

Sumário

1 Introdução.....	12
2 Revisão bibliográfica.....	14
2.1 Amoreira-Preta.....	14
2.2 Cultura de tecidos vegetais.....	15
2.2.1 Componentes do meio nutritivo MS.....	16
2.2.2 Micropropagação de Amoreira-Preta.....	17
2.2.3 Aclimatização de Amoreira-Preta.....	18
2.2.4 Sementes sintéticas.....	19
2.2.5 Conservação in vitro de Banco de Germoplasma.....	20
3 Objetivos.....	22
3.1 Objetivo geral.....	22
3.2 Objetivo específico.....	22
4. Material e métodos.....	23
4.1 Material vegetal.....	23
4.2 Micropropagação.....	23
4.2.1 Aclimatização.....	23
4.3 Encapsulamento de Amoreira-Preta.....	24
5. Resultados e discussão.....	27
5.1 Micropropagação.....	27
5.2 Produção de sementes sintéticas.....	30
6. Conclusões e perspectivas.....	35
Referências.....	36

Lista de Tabelas

Tabela 1	Composição do meio de cultura MURASHIGE & SKOOG.....	17
Tabela 2	Percentagem de Sobrevivência, contaminação e oxidação de unidades encapsuláveis de seis cultivares de amoreira-preta após sete dias.....	33

1. Introdução

As plantas apresentam importância inestimável para o homem, principalmente em relação à sobrevivência e desenvolvimento deste, e destacam pela sua variabilidade e totipotencialidade. Um dos campos de conhecimento que contribui para o melhor entendimento das plantas é a cultura de tecidos vegetais, a qual está voltada para o estudo da morfogênese, fisiologia, anatomia e genética de espécies de interesse. Scagliusi et al. (2008) abordam que o uso cada vez mais aplicado das técnicas de cultura de tecidos e células pode auxiliar ainda mais na evolução dos programas de melhoramento de plantas, acelerando, simplificando e tornando mais eficiente o processo de obtenção de novas cultivares. Com isso, a cultura de tecidos auxilia na manutenção de qualidade de espécies importantes, otimizando, por exemplo, técnicas de produção e de programas de conservação dos recursos genéticos vegetais.

A cultura de tecidos é, então, uma ferramenta essencial de clonagem de plantas em escala comercial, além de fornecer apoio na obtenção de estudos da transformação genética e de conservação das espécies vegetais. Hussain et al. (2012) descrevem que a cultura de tecidos *in vitro* é uma cultura asséptica de células, tecidos, órgãos ou de uma planta inteira em condições nutricionais e ambientais controladas, muitas vezes para produzir clones de plantas. Ela permite, ainda, aperfeiçoar a interação entre fatores abióticos (nutricionais, luminosos, temperatura) e bióticos (hormonais e genéticos), resultando em plantas saudáveis, vigorosas e de alta genética, que podem ser multiplicadas massivamente. Com isso, pode auxiliar, também, na multiplicação de espécies de plantas de difícil propagação, por exemplo, colaborando, dessa forma, para um aumento do potencial do melhoramento das mesmas.

A amoreira-preta (*Rubus* spp.) é uma das espécies frutíferas mais promissoras no país, apresentando boas perspectivas de cultivo e comercialização (SILVA et al., 2016). Ela foi introduzida no Brasil durante a década de 1970 pela Embrapa Clima Temperado (DUTRA et al., 2010). É classificada como um pequeno fruto, assim como morango, mirtilo e framboesa. O fruto vem sendo mais apreciado no mercado devido a sua praticidade no plantio, por seu reduzido uso de agrotóxicos e retorno econômico rápido pela obtenção de produção já no segundo ano após seu cultivo (JACQUES;

ZAMBIAZI et al., 2011). Além de ser saborosa, a amora apresenta alto teor nutricional, trazendo assim, diversos benefícios para a saúde (ALI et al., 2011). A espécie contém fitoquímicos presentes em frutas vermelhas, tais como antocianinas e ácido elágico, o que proporciona benefícios quando aliados a uma boa dieta alimentar. Estes compostos apresentam atividade antioxidante, refletindo em melhorias em doenças cardiovasculares, em alguns tipos de câncer, evitando o envelhecimento precoce e podendo reduzir as doenças neurodegenerativas (ALI et al., 2011; VIZZOTTO et al., 2012).

2. Revisão bibliográfica

2.1 Amoreira-preta

A amoreira-preta (*Rubus* spp.), conhecida, também, como *blackberry* em inglês, é uma das espécies frutíferas mais promissoras no Brasil, apresentando boas perspectivas de áreas cultivadas, produtos industriais e comercialização (ANTUNES et al., 2014; SILVA et al., 2016). Ela pertence à família Rosaceae, a qual inclui frutas como a framboesa. Ela foi introduzida no Brasil durante a década de 1970, em Pelotas-RS, no Centro de Pesquisa da Embrapa Clima Temperado, sendo a partir deste período iniciados os estudos da mesma (DUTRA et al., 2010). Atualmente é cultivada nas regiões Sul e Sudeste. Contudo, já havia espécies nativas de *Rubus* no território brasileiro (PEREIRA et al., 2013). Jacques e Zambiasi (2011) relatam que o cultivo deste fruto tem apresentado crescimento significativo em área cultivada no estado do Rio Grande do Sul nos últimos tempos. As características da fruta e das facilidades do cultivo juntamente com a modernização de novas tecnologias de baixo impacto ambiental, impulsionaram o aumento da área plantada nos últimos anos, elevando para 100% a área plantada no país, passando de 250 ha em 2005 para aproximadamente 500 ha (FACHINELLO et al., 2011; ANTUNES et al., 2014 e PEREIRA et al., 2015)

O destaque econômico da espécie advém do baixo custo de implantação, manutenção do pomar e, principalmente, a reduzida utilização de defensivos agrícolas, aliada à opção de diversificação da propriedade agrícola nas regiões mais frias do Brasil, esta cultura apresenta-se como uma boa opção de cultivo à agricultura familiar (COUTO et al., 2009).

A amora-preta é um fruto saboroso que apresenta coloração negra e sabor ácido a doce-ácido (VIZZOTO et al., 2012). O fruto pode ser consumido *in natura*, na forma de polpa, adicionado a diversos outros produtos para incrementar doces e sorvetes, e apresenta boa aceitação no mercado (ANTUNES et al., 2014). Contém teor nutricional apreciável resultante de seus fitoquímicos que oferecem diferentes funções, tais como, antioxidante, anti-mutagênica, anticancerígena quando aliada a uma dieta e estilo de vida adequados. As antocianinas que pertencem à classe dos flavonoides, também,

são encontradas na amora. Elas são pigmentos que conferem coloração que pode variar entre as cores azul, laranja e vermelho. Outros compostos, além de compostos fenólicos, são encontrados na amora, como por exemplo, carotenoides e vitaminas C e E (JACQUES; ZAMBIAZI, 2011).

Dentre as cultivares de amoreira-preta que se destacam são: Tupy, Comanche, Caingangue, Ébano, Guarani, Xavante e BRS Xingu. As cultivares Ébano e Xavante não apresentam espinhos, resultando em facilidades na poda, na condução e na colheita (ANTUNES et al., 2014).

As cultivares em geral podem apresentar diferenças quanto ao sabor e acidez, refletindo assim, em frutos com diferentes teores de sólidos solúveis. Com isso, algumas cultivares são mais apreciáveis para determinada atividade, tais como, a Xavante e Ébano que devido à menor qualidade e conservação dos frutos são indicadas para o processamento (PEREIRA et al., 2008). A cultivar Tupy é a de maior importância no Brasil e, também, mundialmente, a de maior destaque, devido a sua elevada produtividade e à qualidade dos frutos (VOLK et al., 2013).

2.2 Cultura de Tecidos Vegetais

A cultura de tecidos vegetais engloba as técnicas de cultura em meio nutritivo, em condições assépticas, de células, de tecidos ou órgãos de planta, sob condições controladas de densidade de fluxo de fótons, fotoperíodo, temperatura, dentre outros fatores (CARVALHO et al., 2011). É muito utilizada devido ao seu potencial de propagar espécies de interesse livres de patógenos. A tecnologia pode ser utilizada como uma aliada na conservação de espécies importantes para determinada região.

A amoreira-preta é uma espécie que já apresenta um protocolo estabelecido de cultura de tecidos. As plantas são colhidas a campo e levadas ao laboratório para a adequação e aplicação de técnicas de micropropagação. Após determinado tempo, consegue-se estabelecer a espécie e as plantas são multiplicadas, geralmente, em meio de cultivo MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com fitorreguladores, no caso o 6-Benzilaminopurina (BAP), sacarose e ágar. O meio de cultivo precisa ser ajustado o seu pH no

intervalo de 5,8 a 6,2. O material que é multiplicado tem como destino suprir a quantidade necessária para realizar a próxima etapa que é o enraizamento.

2.2.1 Componentes do meio nutritivo MS

O meio de cultura é parte essencial na cultura de tecidos vegetais. Qualquer alteração em um dos componentes do meio ou erro no procedimento de autoclavagem pode interferir no crescimento ou contaminação do cultivo in vitro. Desta forma, para cada tipo de cultivar é necessário adequar os fatores citados anteriormente dependendo do objetivo do estudo (GUERRA et al., 1999). O meio MS composto por sais e vitaminas, apresenta elevada concentração salina, sendo o padrão para uso em cultivo in vitro (Tabela 1).

Tabela 1. Composição do meio de cultura MURASHIGE & SKOOG (1962).

Nome do composto	Fórmula	Concentração final (gL⁻¹)
Nitrato de amônio	NH ₄ NO ₃	1,65
Nitrato de potássio	KNO ₃	1,90
Sulfato de magnésio	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,37
Sulfato de manganês	MnSO ₄ .H ₂ O	0,0169
Sulfato de zinco	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,0086
Sulfato de cobre	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,00025
Cloreto de cálcio	CaCl ₂ .2H ₂ O	0,441
Ácido bórico	H ₃ BO ₃	0,0062
Fosfato de potássio	KH ₂ PO ₄	0,17
Iodeto de potássio	KI	0,00083
Molibdato de sódio	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,025
Cloreto de cobalto	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,000025
Sódio EDTA	Na ₂ .EDTA	0,03725
Sulfato de ferro	FeSO ₄ .7H ₂ O	0,02785
Cloridrato de tiamina	C ₁₂ H ₁₈ Cl ₂ N ₄ OS	0,0005
Cloridrato de piridoxina	C ₈ H ₁₁ NO ₃ HCl	0,0005
Ácido nicotínico	C ₆ H ₅ NO ₂	0,0005
Glicina	C ₂ H ₅ O ₂ N	0,002
Mio-inositol	C ₆ H ₆ (OH) ₆	0,1
Sacarose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	30
Ágar		7,5

Fonte: Murashige & Skoog (1962).

2.2.2 Micropropagação de Amoreira-Preta

Segundo LEITZKE et al. (2009), é uma técnica que apresenta inúmeras vantagens em comparação com os métodos tradicionais utilizados na propagação de amoreira-preta, especialmente quanto à maior sanidade das mudas, obtenção de genética uniforme e em um curto espaço de tempo. Pode-

se definir como o método que compreende às etapas de multiplicação, enraizamento e aclimatização.

No caso da amoreira-preta, os protocolos de micropropagação já estão estabelecidos, sendo amplamente utilizados atualmente. O método visa a utilização de meristemas ou ápices caulinares os quais são excisados delicadamente de ramos jovens de plantas que ficam armazenadas em casas de vegetação. O método de propagação *in vitro* apresenta, então, o objetivo de oferecer a obtenção de mudas livres de contaminações de vírus, fungos ou nematoides a fim de suprimir esta problemática de contaminação. A espécie é propagada em grande parte através de estacas de raiz, rebentos e hastes novas, tais formas que acarretam elevados índices de difusão de pragas e doenças (DUTRA et al., 2010; SILVA et al., 2016).

Os explantes foram constituídos por segmentos nodais contendo uma gema axilar, obtidas de brotações multiplicadas *in vitro* a cada 30 dias, oriundas de meristemas excisados de ramos jovens de plantas devidamente identificadas, mantidas em casa de vegetação. As culturas foram subcultivadas a cada 30 dias, até a obtenção de material suficiente para a execução do experimento

A taxa habitual de multiplicação obtida em plantas de amoreira-preta em cada subcultivo é de 5-7 plântulas na média, dependendo da cultivar adotada (DUTRA et al., 2010).

2.2.3 Aclimatização de Amoreira-Preta

A aclimatização é o processo na cultura de tecidos de plantas para se referir à adaptação gradual dos propágulos quando transferidos das condições *in vitro* para as condições *ex vitro* (CARVALHO et al., 2011). Além disso, estes autores citam que muitos pesquisadores utilizam o termo aclimatação para se referir também à aclimatização ainda como a resposta a alterações ambientais naturais, relacionada aos eventos fisiológicos adaptativos duradouros, levando ao aumento de tolerância às contínuas ou repetitivas exposições às condições naturais de estresses climáticos. Estas novas condições devem ser passadas às

plantas progressivamente, de forma que elas não sofram estresses que possam culminar em danos profundos ou mesmo em sua morte (SILVA et al., 1995).

O processo de aclimatização representa uma etapa importante na micropropagação, porém, ao mesmo tempo, podendo ser considerada como um fator limitante no processo como um todo de obtenção de mudas em função da grande diferença entre as duas condições ambientais (SOUZA JÚNIOR et al., 2001; PEREIRA et al., 2005). Pode-se destacar que sendo uma etapa limitante para muitas plantas, elas podem não conseguir se adaptarem e não sobreviverem devido a essa transferência das condições in vitro para o ambiente natural. Dentre as variáveis mais importantes que irão favorecer o desenvolvimento das mudas durante o processo de aclimatização estão incluídos, por exemplo, o tipo de substrato, o recipiente no qual as plantas serão cultivadas, a umidade relativa e a temperatura ambiental (SOUZA JÚNIOR et al., 2001).

Pereira et al. (2005), citam que para minimizar os impactos decorrentes de mudanças climáticas do processo da passagem das plantas de condição in vitro para ex vitro é necessário escolher um substrato adequado e umidade adequada a fim de que condições adversas associadas a variações nestes dois aspectos desencadeiem um estresse naquelas. De acordo com Sutter e Hutzell (1984), a retirada de plântulas de condições controladas in vitro acarreta um estresse crítico na mesma, necessitando, dessa forma, conseguir manter a umidade alta. Na etapa de aclimatização, portanto, as mudas começam a ativar seus fotossistemas 1 e 2 e a formação de cloroplastos, entre outros fatores fisiológicos, para que todo este processo seja perfeito e as mesmas se constituam de todas as suas estruturas funcionais as quais são essenciais para o seu desenvolvimento (Wetzstein & Sommer, 1982).

2.2.4 Sementes Sintéticas

A tecnologia de encapsulamento de segmentos oriundos de plântulas cultivadas in vitro compõem uma das principais ferramentas tecnológicas que se

integra à micropropagação, com aproveitamento tanto para conservação quanto para a propagação *in vitro* de espécies.

A reunião de técnicas que tem por objetivo a utilização de embriões somáticos como sementes funcionais denomina-se sementes sintéticas. Mondo et al., (2008), relatam em sua revisão que a definição mais aceitável de sementes artificiais, dada por Aitken-Christie et al., (1994) é a de que estas são “embriões somáticos artificialmente encapsulados, broto ou outros tecidos, que possam ser utilizados para cultivo *in vitro* ou *ex vitro*”, e afirma que essa tecnologia de multiplicação de plantas a partir de embriões somáticos e não-somáticos, também, conhecida como sementes artificiais, constitui-se em uma promissora ferramenta no âmbito da agricultura, sendo viável e disponível.

O encapsulamento de espécies requeridas de frutas ou outras espécies de interesse é uma alternativa para preservar genótipos existentes. Cid (2004) em seu trabalho apresenta a explicação de que tal técnica é uma modalidade da área de cultura de tecidos de plantas que consiste em realizar o encapsulamento de embriões somáticos, ápices caulinares ou gemas axilares. Na técnica ocorre a complexação da gema com a adição de CaCl_2 e, logo, após a descomplexação com o KNO_3 . O alginato é um reagente utilizado no processo de encapsulamento por sua ação gelificante a qual prende o propágulo utilizado. Quando o alginato de sódio entra em contato com cátions di e trivalentes, complexa-se e há a formação do alginato de cálcio. O que ocorre é que os cátions metálicos formam ligações iônicas entre o ácido carboxílico das moléculas de ácido glucurônico do alginato. O aspecto resistente e firme do encapsulamento são funções da proporção entre os ácidos glucurônico e manurônico, os cátions e o tempo de complexação (GUERRA et al., 1999; REDENBAUGH et al., 1991).

2.2.5 Conservação *in vitro* em Banco de Germoplasma

A cultura de tecidos vegetais pode ser aplicada na manutenção de espécies de importância econômica e que são essenciais para manter a sustentabilidade de sua existência, visto que o Brasil apresenta a maior biodiversidade do planeta. Os bancos de germoplasma podem auxiliar na proteção de espécies, pois eles são depósitos de recursos genéticos vivos a fim

de obter materiais para serem estudados futuramente. Uma problemática importante a qual se justifica a necessidade de cuidar da biodiversidade existente no planeta se deve ao uso desordenado dos recursos presentes nela (SIMINSKI et al., 2004; SARTORETTO et al., 2010).

Com o auxílio desses bancos é possível evitar a extinção de espécies de interesse de uma região ou país, garantindo, dessa forma, que as próximas gerações não sejam prejudicadas pela falta de plantas específicas as quais, muitas vezes, foram obtidas a partir de técnicas de melhoramento genético ou espécies por ações de exploração inadequada do homem. Esses bancos, portanto, apresentam significativa importância devido a assegurar, por exemplo, a estabilidade alimentar futura como destacado por Vargas et al. (2014), que ao criarem um banco de germoplasma in vitro, assim como o encontrado na Embrapa Clima Temperado, pode-se ter o oferecimento de um apoio necessário aos programas de melhoramento genético, possibilitando, dessa forma, a geração de um material básico isento de contaminação, conservação e o intercâmbio de germoplasma sadio, de forma rápida e segura.

Portanto, esta ferramenta de armazenamento de material vegetal requerido aliada aos conhecimentos de cultura de tecidos juntamente com a tecnologia de produção de sementes sintéticas se pode assegurar a conservação da biodiversidade do planeta.

3. Objetivo

3.1 Objetivo geral

Produzir sementes sintéticas de cultivares de amoreira-preta micropropagadas (BRS Xingu, Caingangue, Comanche, Guarani, Ébano e Tupy) já estabelecidas in vitro.

3.2 Objetivos específicos

- Multiplicar in vitro as cultivares de amoreira-preta.
- Realizar técnica de aclimatização em seleções de amoreira-preta.
- Produzir sementes sintéticas por meio de gemas axilares de amoreira-preta com as seguintes cultivares: BRS Xingu, Caingangue, Comanche, Ébano, Guarani e Tupy.

4. Material e Métodos

4.1 Material vegetal

O material vegetal foi obtido de amostras de explantes de cultivares de amoreira-preta (BRS Xingu, Caingangue, Comanche, Guarani, Ébano e Tupy) a partir do banco de germoplasma da Embrapa Clima Temperado em Pelotas, RS. Para realização dos experimentos foram utilizadas as condições de meio de cultura específicos para cada etapa.

4.2 Micropropagação

Por meio de repicagens sob condições assépticas, foram realizadas as multiplicações de explantes obtidos por excisão de cultivares de amoreira-preta. Foram preparados, anteriormente, o meio padrão MS, utilizado em cultivo in vitro, com componentes nutritivos de acordo com a Tabela 1 (sais e vitaminas do meio MS) e suplementado com 1 mg L⁻¹ do fitorregulador BAP, 30 g L⁻¹ de sacarose e 7,5 g L⁻¹ de ágar. O pH do meio de cultura foi ajustado entre 5,8 e 6,2. Os meios foram colocados em frascos de vidro, adicionando em cada um 20 mL, tampados com papel alumínio, autoclavados e armazenados em sala de cultivo sob condições ambientais de 23±2°C e fotoperíodo de 16 horas. Para a excisão, pinças e utensílios foram lavados com lâ de aço e levados à estufa por cerca de 10 minutos, apenas para secar, sob a temperatura de 120 °C. O material foi retirado da estufa e enviado para o fluxo devidamente desinfetado com álcool 70%.

4.2.1 Aclimatização

O material utilizado para aclimatização foi oriundo de seleções denominadas Black seguidas das seguintes identificações numéricas: 305, 312, 328, 331 e 339. Essas seleções foram utilizadas para essa etapa da micropropagação ao invés das cultivares de amora já estabelecidas in vitro,

devido ao tempo curto que se tinha à disposição para realização do estudo e, também, pelo material vegetal auxiliar no progresso do processo de aprovação de uma cultivar. O meio de cultivo das seleções foi removido completamente das plantas com sucessivas lavagens em água corrente. As plântulas foram armazenadas, ligeiramente, com papel umedecido antes de serem levadas para a casa de vegetação. Após, elas foram dispostas em bandejas de isopor com capacidade de 72 mudas e, nestes espaços, adicionados substratos de turfa fértil os quais servem para fornecer nutrientes ao desenvolvimento das amoras durante o período de aclimação. Após a inserção nas bandejas, as plântulas foram regadas e encobertas por uma lona de plástico a qual deixaria o ambiente com umidade adequada por cerca de 15 dias. As plântulas foram inspecionadas a fim de observar o nascimento das folhas novas. Com isso, retirou-se o plástico e aguardou-se mais 15 dias na casa de vegetação.

4.3 Encapsulamento de Amoreira-Preta

O material utilizado para o encapsulamento foram gemas axilares obtidas de brotações in vitro de plantas das seguintes cultivares de amoreira-preta: Caingangue, Comanche, Ébano, Guarani, BRS Xingu e Tupy. Foram preparadas soluções as seguintes soluções: CaCl_2 (100 mM), KNO_3 (100 mM), alginato de sódio 5%. No meio MS utilizado foram acrescentados BAP (1mg L^{-1}), inositol (1mg/mL) e sacarose (30 g L^{-1}). O pH foi ajustado entre 5,8 – 6,2 antes de colocar as soluções para autoclavar.

Gemas axilares obtidas a partir de brotações in vitro foram encapsulados em matriz de alginato de sódio 4,0% (p/v) constituída de meio MS suplementado com 3% de sacarose e 6-Benzilaminopurina (BAP). Posteriormente, as unidades encapsuláveis foram individualmente resgatadas e gotejadas em solução de cloreto de cálcio (0,1 M), na qual permaneceram por 15 minutos para complexação. As sementes sintéticas foram submetidas a sucessivas lavagens em água destilada e esterilizada, descomplexadas e inoculadas em meio de cultura (MS) mantidas por 30 dias a $23\pm 2^\circ\text{C}$ com fotoperíodo de 16 horas e radiação fotossintética ativa de $45\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$.

O diagrama 1 ilustra as etapas realizadas, em ordem crescente, para a produção de sementes artificiais. Durante a elaboração daquelas os utensílios e as soluções para encapsular gemas axilares de amoreira-preta foram organizadas no fluxo laminar. Foi realizado a seleção do material vegetal para que a excisão das cultivares, obtendo, dessa forma, as gemas de maneira adequada. Nas partes requeridas do material vegetal, após a excisão, foram adicionadas, com o auxílio de uma pipeta, a solução de alginato de sódio 4%, deixando agir por cerca de 1 minuto. Minuciosamente, adicionou-se às gemas axilares, já envolvidas por uma espécie de envoltório formado pela adição de alginato, com o auxílio de uma pinça a solução de cloreto de cálcio, deixando estas imersas durante cerca de 15 minutos. Posteriormente ao tempo requerido, retirou-se o material da solução anterior e colocou aquelas em solução de nitrato de potássio, deixando em repouso por cerca de 10 minutos. Após estas etapas, as cápsulas formadas foram lavadas com água deionizada. As sementes sintéticas foram colocadas com uma pinça, delicadamente, em frascos de vidro contendo 20 mL de meio MS e, incubadas na sala de cultivo sob luminosidade $46-55 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas. Cada frasco foi armazenado contendo 5 cápsulas de alginato. O número de sementes germinadas foi avaliado aos 7 dias.

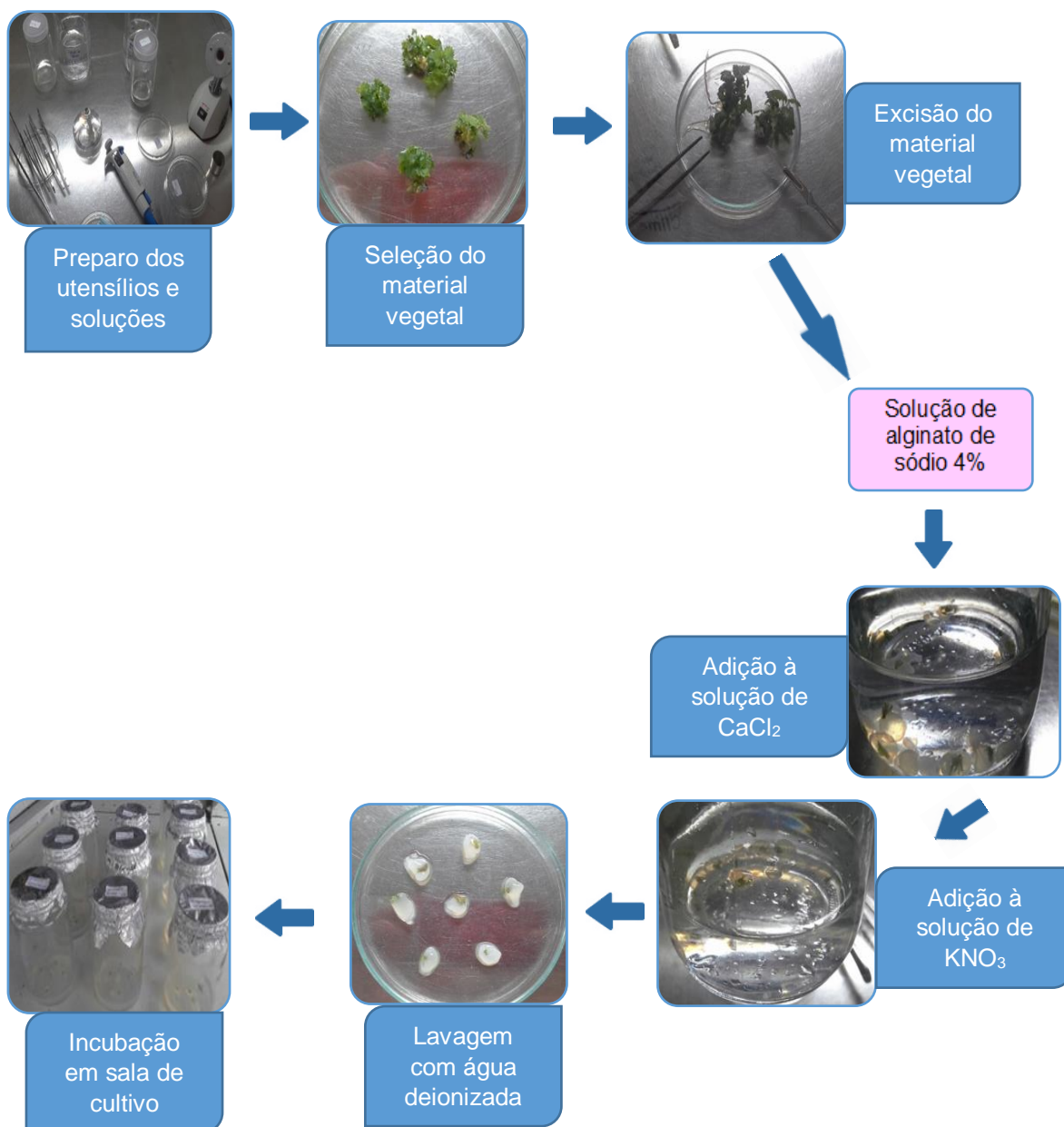


Diagrama 1 – Resumo das etapas do processo de encapsulamento de gemas de amoreira-preta.

5. Resultados e discussão

O material vegetal que já estava estabelecido foi submetido aos protocolos de cultivo in vitro permitindo a obtenção de material suficiente para a produção de sementes sintéticas.

Todavia, mesmo obtendo boa quantidade de explantes suficientes para a execução da técnica in vitro, ocorreram problemas com contaminação em três cultivares de amoreira-preta por microrganismos que inviabilizaram a avaliação de 50% das sementes produzidas.

5.1 Micropropagação

Na micropropagação, as repicagens realizadas (Figura 2) com o material já estabelecido in vitro resultaram em material vegetal suficiente para a etapa de produção de sementes sintéticas, pois os explantes se desenvolveram com êxito (Figura 3). Em alguns frascos, após alguns dias de crescimento, o material excisado apresentou oxidação, sendo necessário trocar de lugar os explantes no próprio meio, sem mudar de frasco. Neste procedimento, também, foi realizado em fluxo laminar e em condições assépticas. Após mudar os explantes de localização, os frascos voltaram para a sala de cultivo para completar a etapa de multiplicação de amoreira-preta. Portanto, após o período de incubação, todas as cultivares repicadas apresentaram bom desenvolvimento. A cultivar BRS Xingu já tinha material vegetal suficiente, por isso não foi realizado repique para a sua multiplicação como as outras cultivares.

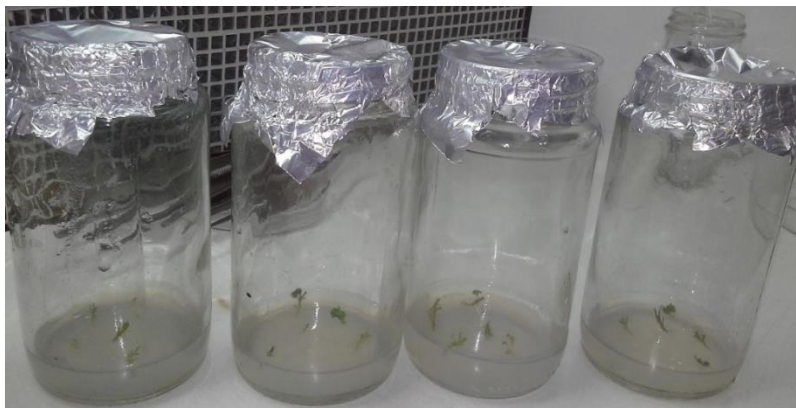


Figura 2 – Subcultivo cultivares Comanche/Ébano (da esquerda para a direita).
Foto: Camila Müller Dallmann



Figura 3 - Cultivares multiplicadas (da esquerda para à direita) Caingangue, Comanche, Ébano, Guarani, Tupy e Xavante.
Foto: Camila Müller Dallmann

Na próxima etapa da micropropagação, o material vegetal resultante de seleções de amoreira-preta foi submetido à aclimatização (Figuras 4 e 5). O desenvolvimento das plântulas foi inspecionado ao longo do processo, que apresentou duração de 30 dias, a fim de observar o aparecimento das primeiras folhas. As folhas emitidas na aclimatização consideram-se funcionais, já aquelas in vitro não. Na Figura 6 pode-se observar a proteção com a cobertura plástica que proporcionava às futuras mudas um ambiente com temperatura e umidade elevada. Esta etapa preparou as plantas para se adaptarem a condições que se encontram a campo. Depois de aguardar mais 15 dias na casa de vegetação (sem a cobertura de plástico) as novas mudas já podiam ser transplantadas para o solo.



Figura 4 – Preparo para a aclimatização de seleções de amoreira-preta.
Foto: Camila Müller Dallmann



Figura 5 – Início da aclimatização de seleções de amoreira-preta.
Foto: Camila Müller Dallmann



Figura 6 – Cobertura das plantas submetidas à aclimatização.
Foto: Camila Müller Dallmann

As mudas de amoreira-preta (Figura 7), já desenvolvidas, estavam prontas para remanejá-las ao solo. Essa etapa final de aclimatização apresenta-se como limitante para as plantas, devido a elas, muitas vezes, acabar por não sobreviverem devido à transferência das condições *in vitro* para o ambiente

externo. Isto pode estar relacionado com à baixa capacidade fotossintética, desidratação, absorção de nutrientes e/ou doenças.



Figura 7 – Mudas desenvolvidas.

Foto: Camila Müller Dallmann

5.2 Produção de sementes sintéticas

Na técnica de produção das sementes artificiais ocorreu a complexação com a solução de CaCl_2 e, logo, após, a descomplexação com KNO_3 , finalizando com lavagens utilizando água deionizada (Figura 8).

Foram observadas oxidações (Figura 9) e contaminações (Figura 10) ao passar dos dias, sendo observado nas cultivares BRS Xingu, Ébano e Tupy. Este último evento, provavelmente, pode ter sido desencadeado da contaminação da solução de alginato de sódio. As cápsulas de cultivares Caingangue, Guarani e Comanche não apresentaram contaminações, apenas em algumas continham oxidações. A percentagem de contaminação da produção de unidades encapsuláveis foi de 50%.



Figura 8 – Sementes sintéticas após lavagem com água deionizada.
Foto: Camila Müller Dallmann



Figura 9 – Sementes sintéticas apresentando oxidação.
Foto: Camila Müller Dallmann



Figura 10 – Sementes sintéticas in vitro com presença de contaminação microbiana.
Foto: Camila Müller Dallmann

A Figura 11 mostra com riqueza de detalhes o bom aspecto de várias sementes sintéticas produzidas, podendo observar a gema axilar no centro da cápsula e a sua cobertura artificial.

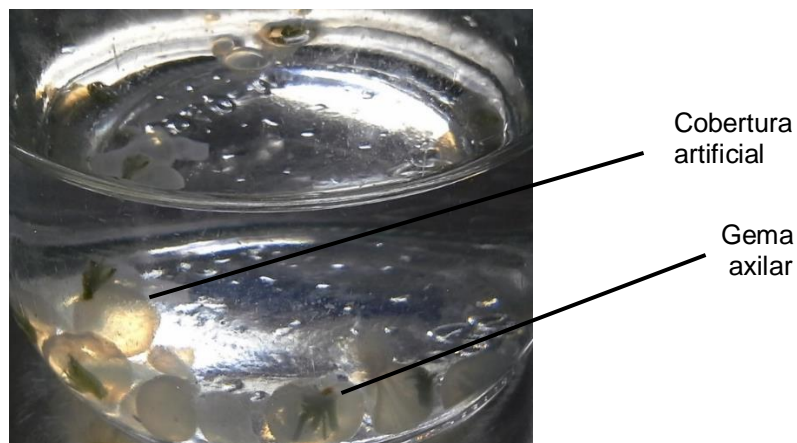


Figura 11 – Sementes sintéticas.
Foto: Camila Müller Dallmann

A Tabela 2 apresenta os resultados obtidos após o período de 7 dias de incubação das sementes sintéticas sob condições controladas de temperatura, umidade e luminosidade na sala de cultivo. A avaliação da viabilidade delas foi feita por três variáveis: sobrevivência, contaminação e oxidação. Constatou-se que a metade das cápsulas produzidas, sendo, respectivamente, Ébano, BRS Xingu e Tupy, apresentaram contaminação microbiana. Esse evento pode ter sido desencadeado por vários fatores como, por exemplo, por utensílios (pinças e bisturis) ou soluções com presença de microrganismos, desligamento da câmara de fluxo devido à ocorrência de alguma queda de energia, explantes oriundos de material *in vitro* já contaminado, dentre outros. O desenvolvimento de microrganismos inviabilizou a sobrevivência dos explantes *in vitro* das cultivares Ébano, BRS Xingu e Tupi. Porém, não se considera inviável o encapsulamento dessas cultivares, pois as variedades Caingangue, Comanche e Guarany apresentaram boa percentagem de sobrevivência.

Tabela 2. Percentagem de Sobrevivência, contaminação e oxidação de unidades encapsuláveis de seis cultivares de amoreira-preta após sete dias.

Cultivares	Sobrevivência	Contaminação	Oxidação
Caingangue	100	0	33
Comanche	93	7	20
Guarani	80	0	33
Ébano	0	100	0
BRS Xingu	0	100	0
Tupy	0	100	0

Diferentemente, então, do que foi observado nas cultivares anteriores, as cápsulas com explantes das variedades Caingangue, Comanche e Guarani apresentaram resultados satisfatórios, pois cerca de 90% delas sobreviveram. As baixas taxas de oxidação verificadas denotam viabilidade do encapsulamento de gemas das cultivares de amoreira-preta. Um detalhe importante a considerar de que os explantes das cultivares foram encapsulados em dias diferentes: primeiramente, Caingangue, Comanche e Guarani e, após, as restantes Ébano, BRS Xingu e Tupy. Isto pode ter contribuído para a contaminação das últimas três cultivares, pois o ideal seria realizar a técnica em todas as seis no mesmo dia.

Como a literatura científica de produção de sementes sintéticas de amoreira-preta ainda se mostra diminuta, são encontrados relatos de publicações em outras culturas, como, por exemplo, batata, a qual a técnica de encapsulamento de explantes de plantas apresentou-se como viável segundo os resultados de Vargas et al. (2014). Neste trabalho foram produzidas cápsulas de matriz de alginato de sódio em *Solanum tuberosum* cv. Macaca e o método mostrou-se viável. Já Mondo et al. (2008) abordaram a aplicação da técnica de produção de sementes artificiais em outras espécies vegetais, fornecendo uma visão geral da importância da utilização da mesma. Já Formoso et al. (2013) avaliaram a regeneração de sementes artificiais produzidas in vitro de

morangueiro San Andreas, não observando oxidações e contaminações após 30 dias de germinação. O diferencial do trabalho é que eles aplicaram diferentes tratamentos durante a produção das unidades encapsuláveis, adicionando fitorreguladores no meio MS como o BAP, zeatina e giberelina antes das soluções de complexação (CaCl_2) e de descomplexação (KNO_3). Foram obtidos os seguintes resultados: a adição de zeatina no meio de cultivo resultou na indução de germinação de cerca de 80% e o BAP de 60% das sementes artificiais. Eles concluíram que o uso de ZEA se mostrou eficiente no encapsulamento de gemas axilares de morangueiro San Andreas.

6. Conclusões e perspectivas

A produção de sementes sintéticas a partir de gemas axilares de amoreira-preta via micropropagação é uma técnica viável.

A multiplicação in vitro de cultivares de amoreira-preta foi realizada com êxito.

As seleções de amoreira-preta foram aclimatizadas corretamente.

A produção de sementes sintéticas das cultivares de amoreira-preta Xingu, Caingangue, Comanche, Ébano, Guarani e Tupy demonstrou viabilidade, conferindo ao processo caráter inovador, obtendo um número significativo de cápsulas.

Portanto, o trabalho fornece uma margem para novos estudos para melhor compreensão da produção de sementes artificiais de amoreira-preta devido à diminuta literatura encontrada sobre o assunto. Com isso, pode-se realizar: variações da matriz de encapsulamento, um número maior de cápsulas e a avaliação em um período de tempo maior delas.

Referências

AITKEN-CHRISTIE, J.; KOZAI, T.; SMITH, M.A.L. Glossary. In: AITKEN-CHRISTIE, J.; KOZAI, T.; SMITH, M.A.L. (Eds.) **Automation and environmental control in plant tissue culture**. Dordrecht: Kluwer, p. 9-12. 1994.

ALI, L.; SVENSSON, B.; ALSANIUS, B.W.; OLSSON, M.E. Late season harvest and storage of *Rubus* berries - major antioxidant and sugar levels. **Scientia Horticulturae**, v.129, p. 376-381. 2011.

ANTUNES, L. E. C. Amora-preta: nova opção de cultivo no Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 1, p. 151-158. 2002.

ANTUNES, L. E. C.; PEREIRA, I. S.; PICOLOTTO, L.; VIGNOLO, G. K.; GONÇALVES, M. A. Produção de amoreira-preta no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, p. 100-111. 2014.

CASTRO, M. C. **Estabelecimento in vitro sob condições mixotróficas e criopreservação de *Hancornia speciosa* Gomes**. 75f. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Programa de Pós-Graduação em Genética & Melhoramento de Plantas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia. 2015.

CARVALHO, A. C. P. P.; TORRES, A. C.; BRAGA, E. J. B.; LEMOS, E. P. D.; SOUZA, F. V. D. ; PETERS, J. A.; WILLADINO, LILIA ; CÂMARA, T. R. Glossário de Cultura de Tecidos de Plantas. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v. 7, p. 30-60. 2011.

CID, L.P.B. **Sementes Sintéticas**: O desenvolvimento de sementes encapsuladas. *Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento*. n. 32, p. 4-7, jan/jun. 2004.

COUTO, M.; ANTUNES, L. E. C.; CARPENEDO, S.; TREVISAN, R. Crescimento de plantas micropropagadas de amoreira-preta. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 31, n. 3, p. 792-797, set. 2009 .

DUTRA, L. F.; MAYER, K. C. de A.; SILVA, N. D. G.; NINO, A. F. P.; SILVA, F. O. X.; VIEIRA, F. C. B. **Protocolos de micropropagação de plantas II**:

amoreira-preta. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, p. 23. 2010. (Documento 326).

FACCHINELLO, J. C.; HOFFMANN, A.; SANTOS, A.M. dos. Amoreira-preta, framboesa e mirtilo: pequenos frutos para o sul do Brasil. CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 13, 1994, Salvador. **Anais...** Salvador: Sociedade Brasileira de Fruticultura, v. 3, p. 989-990. 1994.

FACHINELLO, J. C.; PASA, M. da S.; SHIMTIZ, J. D.; BETEMPS, D. I. Situação e perspectivas da fruticultura de clima temperado no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, volume especial, p. 109-120. 2011.

FERREIRA, D. S. et al. Compostos bioativos presentes em amora-preta (*Rubus* spp.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 3, p. 664-674. 2010.

FERREIRA, L. V.; PICOLOTTO, L.; COCCO, Carine; FINKENAUERL, D.; ANTUNES, L. E. C. Fitotecnia. Produção de amoreira-preta sob diferentes sistemas de condução. **Revista Ciência Rural**, Santa Maria, v. 46, n. 3, p. 241-247, mar. 2016.

FORMOSO, R. S.; VARGAS, D. P.; DUTRA, L. F. Encapsulamento de Gemas Axilares in vitro de Morangueiro San Andreas. **Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão**, v. 5, n. 2, 2013.

GRIFFITHS, A. J. F.; MILLER, J. H.; SUZUKI, D. T.; LEWONTIN, R.C. e GELBART, W. M. Introdução à genética. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 794. 2002

Guerra, M.P.; Torres, A.C.; Teixeira, J.B. Embriogênese Somática e Sementes Sintéticas. In: Torres, A.C.; Caldas, L.S.; Buso, J.A. (eds.). Culturas de Tecidos e Transformação Genética de Plantas. Brasília, Embrapa-CBAB, v. 2, p. 533-568. 1999.

HUSSAIN, A., QARSHI, I.A., NAZIR, H., ULLAH, I. **Plant Tissue Culture: Current Status and Opportunities**. In: LEVA, A., RINALDI, L.M.R. Recent advances in plant in vitro culture. 1st edition. In Tech, Croatia, p. 210. 2012.

JACQUES, A. C.; ZAMBIAZI, R. C. Fitoquímicos em amora-preta (*Rubus* spp.). **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, p. 245-260. 2011.

- LARRUSCHAIM, L.; ILHA, H.; Produção de amora-preta e framboesa em regiões de clima temperado. **Informe Agropecuário**, v. 33, n. 268, p. 58-67. 2012.
- LEITZKE, L. N.; DAMIANI, C. R.; SCHUCH, M. W. Multiplicação e enraizamento in vitro de amoreira-preta 'Xavante': efeito da concentração de sais, do tipo de explante e de carvão ativado no meio de cultura. **Ciênc. agrotec.** Lavras, v. 33, p. 1959-1966. 2009.
- LEITZKE, L. N.; DAMIANI, C. R.; SCHUCH, M. W. Meios de cultura, concentração de AIB e tempo de cultivo no enraizamento in vitro de amoreira-preta e framboeseira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, n. 2, p. 582-587. 2009.
- MAAS, J. L.; GALLETTA, G. J.; STONER, G. D. Ellagic acid, an anticarcinogen in fruits, especially in strawberry: a review. **HortScience**, Alexandria, v. 26, n. 1, p.10-14. 1991.
- MONDO, V. H. V.; CICERO, S. M.; Aspectos sobre a tecnologia de sementes sintéticas. **Informativo ABRATES**, v. 18, n.1,2,3, p. 023-029. 2008.
- MOREIRA, M. A.; CARVALHO, J. G.; PASQUAL, M.; FRÁGUAS, C. B.; SILVA, A. B. Efeito de substratos na aclimatização de mudas micropropagadas de abacaxizeiro cv. Pérola, **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 5, p. 875-879. 2006.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497. 1962.
- OLIVEIRA, M. Extração, isolamento e caracterização parcial de lectinas de folhas de *Bauhinia variegata* var. "candida". 2006. 69f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2006
- PASA, M. da S. et al. Qualidade de luz e fitorreguladores na multiplicação e enraizamento in vitro da amoreira-preta 'Xavante'. *Ciência Rural*, v. 42, n. 8, p.1392-1396. 2012.
- PEREIRA, M. C. T.; NIETSCH, S.; FRANÇA, A. C.; NUNES, C. F.; LIMA, C.; GONÇALVES, V. D.; SALLES, B. P.; MORAIS, D. L. B.; KOBAYASHI, M. K. Aclimatização de mudas micropropagadas de bananeira sob diferentes condições de luminosidade. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 27, n. 2, p. 238-240. 2005.

PEREIRA, I. S. **Adubação de pré-plantio no crescimento, produção e qualidade da amoreira-preta (Rubus sp.)**. 2008. 148f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas. 2008.

PEREIRA, I. S.; SILVEIRA, C. A. P.; PICOLOTTO, L.; SCHNEIDER, F. C.; GONÇALVES, M. A.; VIGNOLO, G. K.; ANTUNES, L. E. C. Constituição química e exportação de nutrientes da amoreira-preta. **Revista Congrega**, URCAMP, v. 9, p. 1-10. 2013.

PEREIRA, I. S.; NAVA, G.; PICOLOTTO, L.; VIGNOLO, G. K.; GONÇALVES, M. A.; ANTUNES, L. E. C. Exigência nutricional e adubação da amoreira-preta. **Revista Ciências Agrárias**, v. 58, n.1, p. 96-104, jan./mar. 2015.

REDENBAUGH, K.; FUJII, J. A.; SLADE, D. Synthetic seed technology. Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants. San Diego, academic Press, v. 8, p. 35-74, 1991.

SARTORETTO, L. M.; FARIAS, P. C. M. Diversidade genética e técnicas biotecnológicas Unoesc & Ciência – **ACET**, Joaçaba, v. 1, n. 2, p. 155-162, jul./dez. 2010.

SCAGLIUSI, S. M. **A cultura de tecidos e o melhoramento genético vegetal**. Seedquest. Dezembro, 2008.

SILVA, A. T. da; PASQUAL, M.; ISHIDA, J.S.; ANTUNES, L.E.C. Aclimação de plantas provenientes da cultura in vitro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 30, n. 1, p. 49-53, jan. 1995.

SILVA, N. D. G. da; DUTRA, L.F.; BIANCHI, v. j.; SOMMER, L. R.; VARGAS, D. P.; PETERS, J. A. "Conservação in vitro de amoreira-preta: Crescimento lento." **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v.12.1 p. 7-12. 2016.

SIMINSKI, Alexandre; et al. Sucessão florestal secundária no município de São Pedro de Alcântara, litoral de Santa Catarina: estrutura e diversidade. **Ciência Florestal**, v. 14, n. 1, p. 21-33, 2004.

SOUZA JÚNIOR, E. E.; BARBOZA, S. B. S. C.; SOUZA, L. A. C. Efeitos de substratos e recipientes na aclimação de plântulas de abacaxizeiro Ananas comosus(L.) Merril] cv. Pérola. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 31, n. 2, p. 147-151. 2001.

VARGAS, D. P.; DUTRA, L. F.; FORMOSO, R. S.; DA COSTA, R. R.; CORADIN, J. H.; TAVARES, V. S.; PEREIRA, A. S.; CASTRO, C. M. Sementes sintéticas: Tecnologia para viabilizar a conservação in vitro da batata. **Revista Batata Show**, Ano 16, n. 38, Abr. 2014.

VIZZOTTO, Márcia et al. Teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante em diferentes genótipos de amoreira-preta (*Rubus* sp.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 34, n. 3, p. 853-858, set. 2012.

VOLK, G. M.; OLMSTEAD, J. W.; FINN, C. E.; JANICK, J. The ASHS Outstanding Fruit Cultivar Award: A 25-year Retrospective. **Hortscience**, Alexandria, v. 48, n. 1, p. 4-12. 2013.

WETZSTEIN, H.Y.; SOMMER, H.E. Leaf anatomy of tissue-cultured *Hiquidambar styraciflua* (Hamamelidaceae) during acclimatization. **American Journal of Botany**, Columbus, v.69, n.10, p.1579-1586, nov-dec,1982.

WILLIAMS, E.S., MAHESWARAN, B. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behavior of cells as an embryogenic group. *Ann. Bot.*, v. 5, p. 443-462. 1986.