

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Instituto de Biologia
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal



DISSERTAÇÃO

**CONSERVAÇÃO IN VITRO DE AMOREIRA-PRETA VIA CRESCIMENTO
LENTO**

RAFAELA SILVA FORMOSO

Pelotas, 2016

Rafaela Silva Formoso

**CONSERVAÇÃO IN VITRO DE AMOREIRA-PRETA VIA CRESCIMENTO
LENTO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Fisiologia Vegetal.

Orientador: Dr. Leonardo Ferreira Dutra
Co-Orientadores: Dra. Eugenia Jacira Bolacel Braga
Dr. Luis Eduardo Corrêa Antunes

Pelotas, 2016

Rafaela Silva Formoso

**CONSERVAÇÃO IN VITRO DE AMOREIRA-PRETA VIA CRESCIMENTO
LENTO**

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Fisiologia Vegetal, Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 20 de dezembro de 2016.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Leonardo Ferreira Dutra (Orientador), doutor em Agronomia pela Universidade Federal de Pelotas.

Prof. Dr. Luciana Bicca Dode, doutora em Biotecnologia Agrícola pela Universidade Federal de Pelotas.

Prof. Dr. Márcia Wulff Schuch, doutora em Agronomia pela Universidade Federal de Pelotas.

*“Dedico este trabalho aos meus pais Janio e Margareth,
aos meus irmãos Gabriela e Benjamin,
ao meu afilhado Luiz Fernando
e aos meus professores e orientadores”*

Agradecimentos

À Universidade Federal de Pelotas pela oportunidade de realização do curso.

À todos os professores do curso de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal pela confiança e ensinamentos.

Ao meu orientador, Leonardo Ferreira Dutra, pela oportunidade, incentivo e confiança em mim depositada.

A minha coorientadora Eugênia Braga pelas considerações e a Alitcia pela grande ajuda.

À minha ex orientadora Luciana pelos primeiros ensinamentos na cultura de tecidos e a minha amiga Tatiane Casarin que mesmo longe se faz presente.

A todos os meus amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Clima Temperado, em especial Raquel, Letícia, Lorena, Nino, Daniele, Gabi, Daiane e Juliana, pela ajuda e apoio em qualquer momento.

Aos meus colegas, companheiros e amigos conquistados nesta trajetória em Pelotas, pelo companheirismo, apoio e por tudo que passamos juntos.

As minhas amigas de Livramento, que mesmo longe, sempre se fizeram presente, me apoiando em todos os momentos.

Aos meus pais, Janio Formoso e Margareth Fernandes, pela oportunidade, apoio e sincera orientação.

A minha avó Zulema, por todo apoio, carinho e amizade sempre.

A Gabriela, minha irmã mais velha, sempre fonte de inspiração e ao meu filhado Luiz Fernando, que mesmo pequenininho me incetiva a continuar.

A toda minha família pelo amor incondicional.

Obrigada por tudo!

"If you can dream it, you can do it."

Walt Disney

Resumo

FORMOSO, Rafaela Silva. Conservação in vitro de amoreira-preta via crescimento lento, 2016. 53p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A conservação de germoplasma in vitro via crescimento lento é uma alternativa para amoreira-preta, já que esta é geralmente mantida em condições de campo. A técnica de crescimento lento possui diversas vantagens, como o aumento do espaço de tempo entre repicagens, reduzindo a intensidade de mão de obra e os custos da manutenção do material in vitro. No entanto, considerando os diversos fatores que interferem na redução do crescimento in vitro, são necessários ajustes da técnica como os tipos e as concentrações de osmorreguladores adicionados ao meio de cultura. Objetivou-se avaliar o uso de reguladores osmóticos no meio de cultura para conservação de germoplasma de amoreira-preta, cultivares Tupy e Guarani. Gemas axilares oriundas de plantas pré-estabelecidas in vitro foram inoculadas em tubos de ensaio contendo meio MS, acrescido de mio-inositol (100 mg L^{-1}), ágar ($7,5 \text{ g L}^{-1}$) e combinações entre sacarose (0, 15 ou 30 g L^{-1}) e manitol (0, 10, 20 ou 30 g L^{-1}), tendo cada tratamento 25 repetições. Após a inoculação dos explantes, os tubos de ensaio foram transferidos para sala de crescimento com temperatura de $25^{\circ}\text{C}\pm 2$ e fotoperíodo de 16h, onde permaneceram por 10 meses. Após esse período, o material foi transferido para meio de multiplicação onde permaneceu por 30 dias e, posteriormente, o material passou pela etapa de enraizamento, seguido de aclimatização. Foram avaliadas ao longo do experimento a taxa de sobrevivência, comprimento da raiz e parte aérea, taxa de multiplicação, enraizamento, massa seca e fresca dos explantes, teor de umidade e quantificação de prolina. A sobrevivência dos explantes após 10 meses foi maior nos tratamentos contendo menores concentrações de manitol (10 e 20 g L^{-1}), combinadas ou não com sacarose (68,6%), e nos tratamentos contendo sacarose isoladamente (78%). Já nos tratamentos contendo maior concentração de manitol (30 g L^{-1}), combinado ou não com sacarose, observou-se menor percentual de explantes sobreviventes (28,5). Maior comprimento das brotações (35,31 mm) foi observado no tratamento utilizando somente sacarose. Concluiu-se que é possível a conservação in vitro da cultivar Guarani via crescimento lento com adição de osmorreguladores ao meio de cultura, já a `Tupy` apresentou baixa taxa de sobrevivência para maioria dos tratamentos.

Palavras-chave: *Rubus*; conservação; osmorreguladores.

Abstract

FORMOSO, Rafaela Silva. In vitro conservation of blackberry by Slow-growth, 2016. 53p. Paper (Master of Science) Post Graduation Program in Plant Physiology of Federal University of Pelotas, Pelotas.

The in vitro conservation of germplasm through slow growth is an alternative for blackberry conservation, as it is maintained under field conditions. The slow-growing technique has several advantages, such as the increase in the time space between repetitions, reducing the labor intensity and the costs of maintaining the material in vitro. However, considering the various factors that interfere with in vitro growth reduction, adjustments of the technique, such as types and concentrations of osmoregulators added to the culture medium, are required. The objective of this study was to evaluate the use of osmotic regulators in the culture medium for the conservation of blackberry, Tupy and Guarani germplasm. Axillary buds from plants pre-established in vitro were inoculated in test tubes containing MS medium plus myo-inositol (100 mg L^{-1}), agar (7.5 g L^{-1}) and combinations of sucrose (0, 15 or 30 g L^{-1}) and mannitol (0, 10, 20 or 30 g L^{-1}), each treatment having 25 replicates. After inoculation of the explants, the test tubes were transferred to the growth room with a temperature of $25 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ and photoperiod of 16h, where they remained for 10 months. After this period, the material was transferred to a medium of multiplication where it remained for 30 days, and later the material passed through the rooting stage, followed by acclimatization. The survival rate, root and shoot length, multiplication rate, rooting, dry and fresh mass of the explants, moisture content and proline quantification were evaluated throughout the experiment. The survival of the explants after 10 months was higher in treatments containing lower concentrations of mannitol (10 and 20 g L^{-1}), combined or not with sucrose (68.6%), and in treatments containing sucrose alone (78%). In the treatments containing a higher concentration of mannitol (30 g L^{-1}), combined or not with sucrose, a lower percentage of surviving explants was observed (28.5). Larger shoot length (35.31 mm) was observed in the treatment using only sucrose. It was concluded that it is possible to in vitro conservation of Guarani cultivar via slow growth with addition of osmoregulators to the culture medium, whereas `Tupy` presented low survival rate for most treatments

Keywords: *Rubus*; conservation; osmoregulators.

Sumário

1. Introdução.....	14
2. Revisão de Literatura.....	15
2.1 Amoreira-Preta	15
2.2 Cultura de Tecidos	16
2.2.1 Micropropagação.....	17
2.2.2 Enraizamento.....	17
2.2.3.Conservação in vitro.....	19
2.2.4 Crescimento Lento	20
2.2.5 Reguladores Osmóticos.....	20
2.2.6 Resposta ao estresse - Prolina.....	21
3. Materiais e Métodos.....	25
3.1 Efeito da sacarose e do manitol na conservação in vitro de amoreira..	25
3.2 Retomada do crescimento dos explantes provenientes de meio com reguladores osmóticos	26
3.3 Enraizamento dos explantes provenientes de meio com reguladores osmóticos	27
3.4 Aclimatização dos explantes provenientes de meio com reguladores osmóticos	28
3.5 Quantificação de Prolina	28
3.6 Análise estatística	29
4. Resultados e Discussão	29
4.1 Efeito da sacarose e do manitol na conservação in vitro de amoreira	29
4.2 Retomada do crescimento dos explantes provenientes de meio com reguladores osmóticos	38
4.3 Enraizamento e aclimatação dos explantes provenientes de meio com reguladores osmóticos	40
5. Conclusões.....	43
6. Considerações Finais.....	44
7. Referências.....	45

Lista de Figuras

- Figura 1.** Via metabólica da biossíntese de prolina em plantas superiores (via Glutamato). GSA (Ácido glutâmico g-semialdeído); P5C (D1-pirrolina-5-carboxilato), P5CS (P5C sintetase), P5CR (P5C redutase), ProDH (Prolina desidrogenase) e P5CDH (P5C desidrogenase) (MOLINARI, 2006). Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2016.....24
- Figura 2.** Curva Padrão para quantificação de prolina. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2016.....29
- Figura 3.** Percentual de sobrevivência de plantas de amoreira preta ‘Guarani’ após 10 meses de conservação in vitro. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2016.....30
- Figura 4.** Percentual de sobrevivência de plantas de amoreira preta ‘Tupy’ após 10 meses de conservação in vitro. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2016 31
- Figura 5.** Percentual de sobrevivência de plantas de amoreira preta ‘Tupy’ e ‘Guarani’ após 10 meses de conservação in vitro. T1: 0 g L⁻¹ sacarose + 0 g L⁻¹ manitol; T2: 30 g L⁻¹ sacarose + 0 g L⁻¹ manitol; T3: 30 g L⁻¹ sacarose + 10 g L⁻¹ manitol; T4: 30 g L⁻¹ sacarose + 20 g L⁻¹ manitol; T5: 30 g L⁻¹ sacarose + 30 g L⁻¹ manitol; T6: 15 g L⁻¹ sacarose + 0 g L⁻¹ manitol; T7: 15 g L⁻¹ sacarose + 10 g L⁻¹ manitol; T8: 15 g L⁻¹ sacarose + 20 g L⁻¹ manitol; T9: 15 g L⁻¹ sacarose + 30 g L⁻¹ manitol; T10: 0 g L⁻¹ sacarose + 10 g L⁻¹ manitol; T11: 0 g L⁻¹ sacarose + 20 g L⁻¹ manitol; T12: 0 g L⁻¹ sacarose + 30 g L⁻¹ manitol. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2016 31
- Figura 6.** Comprimento da parte aérea de plantas de amoreira preta ‘Guarani’ após 10 meses de conservação in vitro. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2016.....33
- Figura 7.** Aspecto das plantas de amoreira-preta ‘Guarani’ após 10 meses de conservação in vitro. (A) Tratamento 30 g L⁻¹ sacarose + 0 g L⁻¹ manitol; (B) Tratamento com 0 g L⁻¹ sacarose + 30 g L⁻¹ manitol. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2016.....33

Figura 8. Percentual de plantas de amoreira preta 'Guarani' enraizados após 10 meses de conservação in vitro. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2016.....	34
Figura 9. Taxa de multiplicação de plantas de amoreira-preta 'Guarani' após 10 meses de crescimento lento. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2016.	36
Figura 10. Plantas de amoreira-preta, cv. 'Guarani', após 45 dias de enraizamento (A) ex vitro e (B) in vitro. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2016.....	41

Lista de Tabelas

Tabela 1. Combinações de osmorreguladores acrescentadas ao meio MS para controle do crescimento de gemas axilares de amoreira preta ‘Tupy’ e ‘Guarani’ cultivados in vitro. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2016.	26
Tabela 2. Massa fresca do que (g), massa seca do que (g) e teor de umidade (%) de Rubus cv. Guarani após 10 meses em cultivo in vitro com diferentes agentes osmóticos. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2016.	37
Tabela 3. Análise da sobrevivência, comprimento das brotações e da taxa de multiplicação na retomada do crescimento de plantas de amora-preta ‘Guarani’ após 10 meses de crescimento lento. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2016.	40
Tabela 4. Análise da sobrevivência, comprimento da raiz e número de raízes formadas de plantasde amoreira-preta ‘Tupy’ após 45 dias em meio de enraizamento. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2016.	41
Tabela 5. Análise da sobrevivência, comprimento da raiz e da parte aérea e número de raízes formadas de plantas de amoreira-preta ‘Guarani’ após 45 dias no estágio de enraizamento in vitro ex vitro. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2016.	42
Tabela 6. Concentração de prolina em amora-preta ‘Tupy’ após a aclimatização. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2016.	44

1. Introdução

Dentro do grupo das pequenas frutas a amoreira-preta (*Rubus* spp.) é vista como uma das mais promissoras (FACHINELLO et al., 2011; JACQUES; ZAMBIAZI, 2011). Sua propagação dá-se principalmente por meio de estacas de raiz, rebentos e hastes novas (ANTUNES et al., 2008; LEITZKE; DAMIANI; SCHUCH, 2009), sendo a cultura de tecidos uma alternativa, permitindo a produção de mudas isentas de vírus em um curto período de tempo (PASQUAL et al., 2001).

A cultura de tecidos pode auxiliar na conservação de material genético por meio da conservação *in vitro*, seja por meio do crescimento lento ou da criopreservação. Os sistemas de crescimento lento caracterizam-se pela diminuição do metabolismo celular, retardando o desenvolvimento da planta e prolongando os intervalos entre os subcultivos, sem que ocorra a perda da viabilidade (WITHERS; WILLIAMS, 1998). Já a criopreservação consiste na conservação de material em nitrogênio líquido a -196°C garantindo a conservação em longo prazo (REED et al., 2011).

Para obtenção do estado de crescimento lento, podem ser utilizadas diversas estratégias, como a alteração do potencial osmótico do meio de cultura, reduzindo então a disponibilidade de água, e pela utilização de retardantes de crescimento, como inibidores da biossíntese de giberelinas (WITHERS; WILLIAMS, 1998). Além disso, modificações físicas no ambiente podem ser realizadas, como redução da luminosidade e da temperatura da sala de incubação (CASTRO; HILHORST, 2004; MOOSIKAPALA; TE-CHATO, 2010). Porém, para a manutenção do material em ambientes de iluminação reduzida e baixas temperaturas, é necessário o uso de BODs (Biochemical oxygen demand), o que acarreta um custo mais elevado do que apenas a realização de modificações químicas no meio de cultura.

Além disso, a conservação *in vitro* pode ser utilizada para manter o germoplasma protegido, produção de matrizes com alto nível fitossanitário, recuperação de genes de interesse, manutenção da fidelidade genética da

planta matriz, redução de mão de obra e espaço a campo, e para evitar possível mistura na conservação *ex vitro*. Sendo assim, o cultivo *in vitro* auxilia na conservação da espécie, pois permite a manutenção de grande número de acessos em pequeno espaço físico, livre dos riscos existentes a campo, reduzindo os custos de manutenção e garantindo a fidelidade genética (FARIA et al., 2006).

A amoreira-preta já possui um protocolo de micropropagação específico desenvolvido, portanto o que se busca é uma forma de manter os explantes *in vitro* por um longo período de tempo, sem a necessidade de subcultivos frequentes, com o objetivo de diminuir o uso de mão de obra, os custos de manutenção do material e garantir a conservação do material genético. Uma alternativa para isso é a preservação do germoplasma *in vitro*, visto que a conservação desta cultura é realizada em condições de campo.

Com base nisso, o presente estudo teve como objetivo avaliar o uso de reguladores osmóticos no meio de cultura para conservação de germoplasma de amoreira-preta, cultivares Tupy e Guarani, em temperatura normal de cultivo.

2. Revisão de Literatura

2.1 Amoreira-Preta

A amoreira-preta, pertencente à família Rosaceae e ao gênero *Rubus*, é originada da Ásia, Europa e Américas (DONADIO, 2014). Além do *Rubus*, outros gêneros de importância para a fruticultura brasileira pertencem à família Rosaceae, como *Malus*, *Prunus* e *Pyrus* (ANTUNES et al., 2006). A exploração da amora-preta no Brasil teve início com o lançamento das primeiras cultivares brasileiras, Tupy, Guarani e Caingangue, pelo programa de melhoramento genético da Embrapa Clima Temperado (FIGUEIREDO et al., 2013).

O Brasil destaca-se como potencial produtor da espécie e os estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná e Minas Gerais são os principais

produtores de amoreira-preta, sendo que a estimativa de produção no Rio Grande do Sul no ano de 2014 foi de 2.209,5 toneladas em 239,2 ha (ANTUNES, 2014).

Existem espécies de amoreira-preta nativas do Brasil, como as espécies *R. urticaefolius*, *R. erythroclados*, *R. brasiliensis*, *R. sellowii*, *R. imperialis*, porém as cultivares utilizadas atualmente no país são provenientes de cruzamentos envolvendo material genético nativo dos Estados Unidos (ANTUNES, 2014). Atualmente, a cultivar Tupy (híbrido de Comanche x Uruguai) é a mais importante tanto no Brasil quanto no mundo (VOLK et al., 2013). Esta possui alta produtividade, boa adaptação, boa qualidade, com bons níveis de açúcares e acidez equilibrados, cor, pós-colheita e tamanho adequados (DONADIO, 2014). Já a cultivar Guarani apresenta importância intermediária, possuindo características similares à Tupy, porém com menor produtividade e seus frutos são de menor qualidade (ANTUNES, 2014).

A propagação da amoreira-preta dá-se principalmente por meio de estacas de raiz, rebentos e hastes novas (JENNINGS; MCNICOL, 1991; ANTUNES et al., 2008). Outra forma de obtenção de mudas é via cultura de tecidos e, embora seja um método que demande mão de obra especializada, apresenta uma série de vantagens em relação aos métodos tradicionais utilizados na propagação de amoreira-preta, principalmente em relação à maior sanidade das mudas, permitindo a obtenção de milhares de plantas isentas de vírus e geneticamente uniformes em um menor espaço de tempo (LEITZKE et al., 2009).

2.2 Cultura de Tecidos

A cultura de tecidos ou cultura in vitro engloba técnicas de cultura em meio nutritivo, em condições assépticas, de células, tecidos ou órgãos de plantas, sob condições controladas de densidade de fluxo de fótons, fotoperíodo, temperatura, dentre outros fatores. Esta tem sido utilizada na recuperação de plantas livres de vírus e outros agentes causadores de doenças, na conservação e intercâmbio de germoplasma in vitro, na micropropagação rápida de plantas, na recuperação de híbridos

interespecíficos de cruzamentos com incompatibilidade pós-zigótica, na produção de haploides e na transformação genética (CARVALHO et al., 2011).

Com o acelerado crescimento da população mundial, a produção de energia e alimento em quantidade suficiente tem se tornado um desafio, sendo a propagação in vitro de plantas uma das técnicas utilizadas para incrementar a produção de alimentos. Técnicas de cultura de tecidos e células são a base de muitos programas de micropropagação e melhoramento genético, sendo também importantes para pesquisa científica (MIGUEL; MARUM, 2011). Segundo Loyola-Vargas; Ochoa-Alejo (2012), estas são importantes ferramentas biotecnológicas para a produção em larga escala de plantas.

Durante o cultivo in vitro, as plantas se desenvolvem sob diferentes condições no microambiente, tais como componentes do meio de cultura, adição exógena de fitorreguladores e alta umidade no interior dos recipientes (VANSTRAELEN; BENKOVA; 2012). O meio de cultura deve suprir tecidos e órgãos cultivados in vitro com nutrientes necessários ao crescimento. Os macronutrientes são fornecidos ao meio de cultura na forma de sais: cálcio, magnésio e potássio e estes são absorvidos pelas células vegetais como cátions (Ca^{+2} , Mg^{+2} e K^{+}); nitrogênio na forma de amônio (NH_4^{+}) ou nitrato (NO_3^{-}); fósforo como íons fosfato (HPO_4) e (H_2PO_4). Esses sais também podem ser associados a íons dos elementos sódio (Na^{+}) e cloro (Cl^{-}), bem tolerados pelas células vegetais em altas concentrações dos mesmos (PASQUAL, 2001). O potássio entra como íon acompanhante do nitrato, fosfato ou, em alguns casos, do cloreto. O íon exerce suas funções metabólicas e bioquímicas na planta e nas células in vitro, como íon livre, sem incorporação em compostos orgânicos, tornando seu metabolismo muito simples (CALDAS et al., 1998).

2.2.1 Micropropagação

A micropropagação é uma técnica para a propagação vegetativa de planta in vitro, utilizando distintos explantes como ápices caulinares, segmentos nodais e embriões zigóticos (CARVALHO et al., 2011). Durante o processo de micropropagação, as etapas de multiplicação e enraizamento são

extremamente importantes, devido a serem etapas cruciais para a obtenção das novas mudas. O controle dessas etapas depende de diversos fatores, como características intrínsecas da espécie, fonte de luz, meio nutritivo e balanço hormonal (PASA et al., 2012).

O crescimento e o desenvolvimento das plantas são controlados por substâncias orgânicas naturais denominadas fitormônios, os quais são sintetizados em pequenas concentrações e em determinadas regiões das plantas. Estes quando são produzidos artificialmente, são denominados reguladores de crescimento (TAIZ; ZEIGER, 2013). Segundo Schuch e Erig (2005), além das formulações básicas dos meios de cultura normalmente utilizados, o emprego de fitorreguladores é imprescindível para que se obtenha sucesso na propagação de culturas in vitro. O tipo de citocinina utilizado e sua concentração são fatores cruciais para obtenção de sucesso na multiplicação in vitro (VILLA et al., 2006).

Além disso, a micropropagação possibilita a multiplicação de plantas in vitro livres de vírus, via cultivo de meristemas. Para tal, os explantes são oriundos de plantas matrizes que podem estar mantidas no campo ou em casa de vegetação e, após estabelecidas in vitro, são multiplicadas (DUTRA et al., 2010). Em trabalhos desenvolvidos por Villa et al. (2005; 2006), avaliando a multiplicação in vitro de amoreira-preta cultivares 'Ébano' e 'Brazos', foram obtidas melhores respostas para multiplicação com a adição de 1 mg L⁻¹ de BAP ao meio de cultura. A mesma concentração de BAP é recomendada por Dutra et al. (2010), proporcionando taxa de multiplicação em torno de 5 a 7 plântulas em cada subcultivo, podendo variar de acordo com a cultivar.

2.2.2 Enraizamento

O meio de cultura, o tipo de auxina utilizada e sua concentração são os fatores que mais influenciam no enraizamento in vitro, podendo estes variar conforme a espécie e a cultivar. Se a concentração de auxina no meio de cultura for excessiva, ocorre formação de calo na base do explante, comprometendo a rizogênese e o crescimento da parte aérea (LEITZKE;

DAMIANI; SCHUCH, 2009). O ácido Indolbutírico (AIB) é o mais utilizado por não ocasionar fitotoxicidade aos explantes em uma ampla taxa de concentração e ser bastante eficiente em diversas espécies (HARTMANN et al., 1997).

A vantagem do enraizamento *in vitro* em relação ao *ex vitro*, é o maior controle das condições em que se trabalha e, com isso, é possível a obtenção de um alto percentual de enraizamento dos explantes, sendo que esta é uma das etapas mais difíceis da propagação (LEITZKE; DAMIANI; SCHUCH, 2009).

Segundo Leitzke et al. (2009), foi possível obter maior percentual de enraizamento da cultivar 'Xavante' utilizando o meio WPM acrescido de AIB (2,5 μM) sendo que com o aumento da concentração de AIB, foi possível observar redução do comprimento das raízes. Já, Pasa et al. (2012), utilizaram o meio MS também combinado com AIB (1 mgL^{-1}) para enraizamento da espécie, também obtendo resultado positivo.

2.2.3. Conservação *in vitro*

Os bancos de germoplasma *in vitro* são o patrimônio genético de uma espécie conservado em condições de laboratório, com base nas técnicas de cultura de tecidos de plantas. De forma geral, busca-se a redução do metabolismo celular das plantas conservadas com vistas à otimização da gestão da coleção (CARVALHO et al., 2011).

A conservação *in vitro* possui diversas vantagens em relação à conservação no campo, dentre elas: possibilita a manutenção de um grande número de acessos em um pequeno espaço físico, livre de intempéries e riscos que existem no campo, a manutenção da fidelidade genética e facilita a disponibilidade de material para o melhoramento genético e para o intercâmbio de germoplasma. Além disso, a conservação *in vitro* possui a importância econômica, visto que o cultivo *in vitro* é bastante oneroso, requerendo mudança de meio de cultura com frequência, muitas vezes, mensal e, com esta técnica, as trocas podem ser diminuídas para uma ao ano (WITHERS; WILLIAMS, 1998; FARIA et al., 2006). Por outro lado, como desvantagens da

conservação in vitro têm-se a demanda por mão de obra especializada e a necessidade de infraestrutura adequada.

Em geral, dois métodos têm sido utilizados na conservação de plantas in vitro: a criopreservação e o crescimento lento. Na criopreservação, as plantas são mantidas em temperaturas ultra-baixas e, assim, há uma pausa completa do crescimento. Já no crescimento lento, as plantas são submetidas a condições que reduzem ou suprimem o metabolismo das plantas in vitro, aumentando-se assim o intervalo entre os subcultivos, o que leva a uma redução da mão de obra, do espaço e custos para a manutenção das plantas (SCHERWINSKI-PEREIRA et al., 2010).

A redução do metabolismo das plantas diminui de forma significativa o trabalho de manutenção da coleção, pela redução no número de repicagens, e é um dos fatores que pode contribuir para evitar a ocorrência de variação somaclonal. Com isso, a padronização do comportamento das plantas in vitro é um facilitador para a manutenção da coleção, uma vez que permite um maior planejamento para os procedimentos de repicagem (PEREIRA et al., 2007), além das outras vantagens.

Diversos aspectos devem ser considerados no processo de conservação in vitro, como a capacidade de resgatar o material que está conservado, ou seja, a capacidade da planta se manter viável após o tempo de conservação. Muitas vezes o método utilizado para reduzir o metabolismo da planta in vitro pode causar danos irreversíveis, dificultando a recuperação das mesmas para a condição ex vitro (HASSAN; BEKHEET, 2008, GOPAL; CHAUHAN, 2010, OREGO et al., 2012). Dessa forma a redução do metabolismo e o estabelecimento de condições de crescimento mínimo, mantendo a planta saudável e com capacidade de sobreviver, são os principais objetivos em trabalhos de conservação in vitro.

2.2.4 Crescimento Lento

Os sistemas de crescimento lento caracterizam-se pela redução do metabolismo celular retardando o desenvolvimento da planta e tornando os

intervalos entre os subcultivos mais longos, sem a perda da viabilidade (WHITERS; WILLIAMS, 1998). Segundo CARVALHO et al. (2011), as condições de crescimento lento são definidas como condições ambientais (temperatura, fotoperíodo, densidade de fluxo de fótons) e químicas (alterações na composição de meio de cultura) que favorecem a redução do metabolismo da planta, conseqüentemente, ocorrendo a desaceleração do crescimento. Tal condição que é almejada para a manutenção de bancos de germoplasma in vitro.

Diversas estratégias podem ser usadas para a obtenção da condição de crescimento lento, seja pela alteração do potencial osmótico do meio de cultura, reduzindo então a disponibilidade de água, ou por meio da utilização de retardantes de crescimento, especialmente inibidores da biossíntese de giberelinas, hormônio responsável pelo alongamento celular (WITHERS; WILLIAMS, 1998; RADEMACHER, 2000; CASTRO; HILHORST, 2004). Além disso, também é possível realizar alterações no ambiente, como redução da luminosidade e da temperatura da sala de incubação (RADEMACHER, 2000; CASTRO; HILHORST, 2004).

O uso de baixas temperaturas (6 a 8 ° C) é uma técnica bastante utilizada para a conservação in vitro. Porém, manter as plantas em baixa temperatura em regiões quentes requer uma alta demanda de energia, o que gera um elevado custo. Além disso, esse estresse pela baixa temperatura pode levar a excessivas anormalidades fenotípicas (vitrificação, senescência, etc.) em microplantas armazenadas por um longo período (LOPEZ-DELGADO et al., 1998). Sendo assim, uma série de agentes osmóticos tem sido utilizada com o propósito da redução do crescimento de plantas in vitro, sendo os mais utilizados, a sacarose, manitol e sorbitol, os quais ao serem adicionados ao meio de cultura agem externamente, reduzindo a água intracelular, por gradiente osmótico, fazendo com que o crescimento da cultura ocorra de forma mais lenta (DUMET et al., 1993).

Existem poucos trabalhos na literatura com crescimento mínimo de amoreira-preta. Em trabalho realizado com amoreira-preta 'Xavante' e 'Tupy', Silva (2013), observou que a redução de temperatura (6°C) para manter o material in vitro em condições de crescimento lento foi satisfatória no período

de 120 dias. Com a adição do manitol houve uma diminuição na taxa de multiplicação dos explantes, mas que esta foi revertida quando o material foi transferido para sala de crescimento com temperatura normal de cultivo da espécie (25°C).

2.2.5 Reguladores Osmóticos

As adições de carboidratos ao meio de cultura afetam significativamente o crescimento e desenvolvimento das plantas *in vitro*, pois estes atuam tanto como fonte de carbono e energia quanto como reguladores osmóticos do meio (FLORES et al., 2013). Osmorreguladores, tais como sacarose, sorbitol e manitol, ao serem adicionados ao meio de cultura, dependendo da concentração, agem removendo o excesso da água intracelular, por gradiente osmótico, fazendo com que o crescimento dos explantes ocorra de maneira mais lenta (DUMET et al., 1993; SHIBLI et al., 2006), possibilitando a sua conservação por um período mais longo.

A sacarose é um dissacarídeo não redutor universalmente utilizado como fonte de energia e esqueleto de carbono para plantas mantidas *in vitro*. Este açúcar promove aumento de biomassa e sua concentração é um fator determinante no crescimento de plantas em condições *in vitro*. Dessa forma, modificações nas concentrações de sacarose no meio de cultura podem alterar de forma significativa o metabolismo das plantas e vem sendo um dos fatores mais trabalhados na busca do crescimento lento *in vitro* (ANKITA; ANIMESH, 2013).

O manitol e o sorbitol são açúcares alcoólicos que geralmente não são metabolizados por tecidos vegetais, visto que, grande quantidade de espécies não possui uma via natural para a biossíntese de alcoóis açúcares, e por isso são empregados para a redução do potencial hídrico do meio de cultura na conservação *in vitro* (GEORGE, 1993; THORPE et. al., 2008; ARRIGONI-BLANK et al., 2014). São utilizados para alterar as condições osmóticas, proteger as membranas das baixas temperaturas e reduzir a hiperhidricidade, estado fisiológico em que a planta apresenta acúmulo anormal de água

provocado pela difusão passiva da água do meio de cultivo para o interior dos tecidos ou um distúrbio no processo metabólico da planta (KADOTA et al., 2001; FARIA et al., 2006; VASCONCELOS et al., 2012).

Quando os reguladores osmóticos são inseridos no meio de cultura, ocorre uma redução no potencial hídrico, diminuindo a absorção de água e, conseqüentemente, de nutrientes pelos explantes, removendo o excesso de água intracelular por gradiente osmótico e, assim, desacelerando o crescimento vegetal (MARINO et al., 2010; SILVA; SCHERWINSKY-PEREIRA, 2011).

Os osmorreguladores atuam gerando um estresse hídrico pelo aumento da concentração osmótica, influenciando, desta forma no crescimento das plantas *in vitro*. Esse efeito se deve possivelmente a redução da capacidade de absorção de água e de nutrientes do meio de cultura pelas plantas (LEMOS et al., 2002).

2.2.6 Resposta ao Estresse –Prolina

O estresse hídrico desencadeia importantes processos bioquímicos e fisiológicos como, por exemplo, o ajustamento osmótico e, além disso, altera o sistema de defesa de enzimas antioxidantes e peroxidação lipídica (MOLINARI, 2006). Este acarreta no acúmulo de ROS (espécies reativas de oxigênio), tais como radicais superóxido, H_2O_2 e OH (PASTORI; FOYER, 2002). Em baixas concentrações, estes radicais atuam como moléculas sinais na resposta adaptativa das plantas frente ao estresse, porém, em excesso podem causar danos oxidativos nas células (MOLINARI, 2006). Sendo assim, em resposta a deficiência hídrica, muitas plantas sintetizam e acumulam solutos orgânicos, como proteínas, carboidratos, N-amino e prolina (BRAY, 1997).

A L-prolina é um dos 20 aminoácidos presentes nas proteínas de todos os organismos vivos (MOLINARI, 2006). Esta, na forma livre é classificada como um “ ϵ – iminoácido”, devido à ligação do grupo amino a dois átomos de carbono, conferindo características de neutralidade à molécula (KAVI KISHOR et al., 2005). Os aminoácidos são moléculas que contêm uma porção amino (-

NH₂) e um grupo funcional carboxil (-COOH). A prolina é composta por uma porção imino (C=NH), um grupo funcional carboxil e um grupo imino secundário, tendo sido referido como um importante osmoprotetor em diversas plantas (MOLINARI, 2006).

A prolina também atua na manutenção da integridade da membrana plasmática e sua proteção (MANSOUR et al., 1998). Por possuir um anel pirrolina, que confere uma baixa capacidade de doar elétrons, a prolina forma um complexo de transferência de carga e sequestra O₂. Com isso, esse aminoácido pode diminuir o dano causado por fotoinibição nas membranas do tilacóide pelo seqüestro e redução da produção de íons superóxido (REDDY et al., 2004).

Em condições normais em plantas, a prolina constitui menos que 5% dos aminoácidos totais livres, porém, sob diversas formas de estresse a concentração de prolina pode chegar a 80% do “pool” total de aminoácidos (ALIA, 2003).

O acúmulo da prolina pode ocorrer por meio de duas vias paralelas em plantas, uma via ornitina e outra direta (KAVI KISHOR et al., 2005). Em um estado de estresse hídrico, o acúmulo de prolina nas células é provocado por duas vias, ocorrendo à ativação da sua biossíntese e a inativação da sua degradação (JINYUO et al., 2004; GIMENEZ, 2011). Sob déficit hídrico, a prolina parece ser sintetizada principalmente pela via do glutamato (BARTELS; SUNKAR, 2005) (Figura 1).

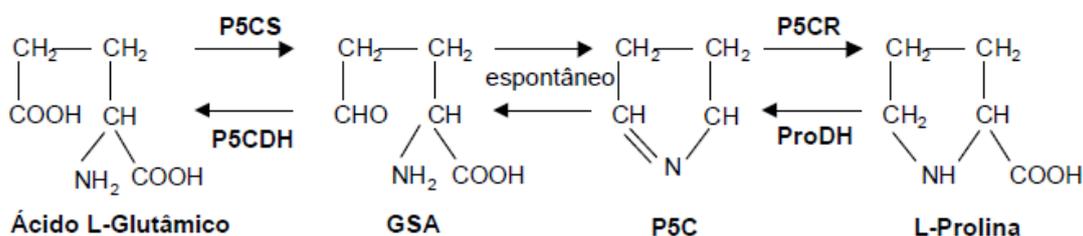


Figura 1. Via metabólica da biossíntese de prolina em plantas superiores (via Glutamato). GSA (Ácido glutâmico g-semialdeído); P5C(D1-pirrolina-5-carboxilato), P5CS (P5C sintetase), P5CR (P5C redutase), ProDH (Prolinadesidrogenase) e P5CDH (P5C desidrogenase) (MOLINARI, 2006). Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2016

Em plantas superiores, a prolina é sintetizada a partir do glutamato via D1-pirrolina-5-carboxilato (P5C) via duas reduções sucessivas, as quais são catalisadas pelas enzimas P5C sintetase (P5CS) e P5C redutase (P5CR) (HARE et al.,1999), de forma que a expressão da P5CR é regulada por variações no potencial osmótico do citoplasma (WILLIAMSON; SLOCUM, 1992), esta redução induz a biossíntese da P5C, acarretando na produção de prolina, com isso, o seu acúmulo na célula está relacionado com mecanismo de ajustamento osmótico (DELAUNEY; VERMA, 1993).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Efeito da sacarose e do manitol na conservação in vitro de amoreira.

Gemas axilares com aproximadamente 1 cm de comprimento, oriundas de plantas de amoreira-preta 'Tupy' e 'Guarani', previamente estabelecidas in vitro, foram inoculadas em tubos de ensaio (35 x 127 mm) com tampa plástica contendo 25 mL de meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), acrescido de mio-inositol (100 mg L^{-1}), ágar ($7,5 \text{ g L}^{-1}$) e combinações entre sacarose (0, 15 ou 30 g L^{-1}) e manitol (0, 10, 20 ou 30 g L^{-1}).

O pH dos meios foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a $120 \text{ }^\circ\text{C}$, 1 atm, durante 20 minutos. Os tubos foram envolvidos com parafilme e as culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, em fotoperíodo de 16 horas com intensidade luminosa de cerca de $40 \mu\text{mol.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

O estudo foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado, fatorial 3 (sacarose) x 4 (manitol), totalizando 12 tratamentos, cada tratamento foi composto por 25 repetições, sendo cada repetição constituída por um tubo de ensaio com uma gema cada (Tabela 1). Os experimentos para ambas as cultivares foram conduzidos separadamente.

Tabela 1. Combinações de osmorreguladores acrescentadas ao meio MS para controle do crescimento de gemas axilares de amoreira preta, cvs 'Tupy' e 'Guarani', cultivadas in vitro. Empresa Clima Temperado, Pelotas, 2016.

Tratamento	Sacarose (g.L ⁻¹)	Manitol (g.L ⁻¹)
1	0	0
2	30	0
3	30	10
4	30	20
5	30	30
6	15	0
7	15	10
8	15	20
9	15	30
10	0	10
11	0	20
12	0	30

As avaliações foram realizadas 10 meses após a inoculação, tendo sido analisadas as seguintes variáveis: sobrevivência, comprimento das brotações, presença de raízes, número de novas brotações, teor de umidade, massa fresca e seca dos explantes inteiros e teor de prolina.

O comprimento das brotações foi realizado com auxílio de um paquímetro digital, sendo medida a maior brotação. O teor de umidade, massa fresca e massa seca foi obtido através da pesagem dos explantes em balança determinadora de umidade Shimadzu.

3.2 Retomada do crescimento dos explantes provenientes de meio com reguladores osmóticos

Gemas axilares com brotações adventícias de amoreira-preta conservadas in vitro por 10 meses, em meio de cultura MS com diferentes combinações de sacarose (0, 15 ou 30 g L⁻¹) e manitol (0, 10, 20 ou 30 g L⁻¹), foram transferidas para meio de crescimento padrão para a espécie. Os

explantes foram assepticamente inoculados em frascos contendo 30mL de meio MS suplementado com 1 mg mL^{-1} de 6-benzilaminopurina (BAP), 30 g L^{-1} de sacarose, 100 mg L^{-1} de mioinositol e geleificado com 7 g L^{-1} de ágar. O material permaneceu em câmara de crescimento em condições já descritas na etapa anterior.

Decorridos 45 dias da inoculação foram realizadas as análises do número de plantas sobreviventes e do número de novas brotações em cada tratamento.

3.3 Enraizamento dos explantes provenientes de meio com reguladores osmóticos

Após 45 dias em meio de multiplicação, as brotações foram transferidas para a fase de enraizamento, a qual foi realizada de duas formas: in vitro e ex vitro.

Para o enraizamento in vitro, utilizou-se meio MS, com $\frac{1}{2}$ da concentração de nutrientes, acrescido de 30 g L^{-1} de sacarose, $0,1 \text{ g L}^{-1}$ de mioinositol, 7 g L^{-1} de ágar e $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ de ácido naftaleno acético (ANA). Os explantes permaneceram nos meios de enraizamento por um período de 45 dias, sob temperatura controlada de $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas e radiação luminosa de $40 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

Já para o enraizamento ex vitro, as plantas foram inseridas diretamente em substrato comercial, em bandejas de isopor com 72 células, onde pertenceram em casa de vegetação com temperatura controlada de $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.

A avaliação foi realizada após 45 dias de cultivo e foi avaliada a sobrevivência, a presença de raízes, o número e tamanho das raízes formadas.

3.4 Aclimatização dos explantes provenientes de meio com reguladores osmóticos

As plantas enraizadas in vitro, após 45 dias, foram levadas para casa de vegetação, onde foram colocadas em bandejas de isopor de 72 células contendo substrato comercial. A avaliação foi realizada após 30 dias de aclimatização onde foi avaliada a sobrevivência das plantas.

Para as plantas que foram enraizadas ex vitro, a etapa de aclimatização ocorreu juntamente com a de enraizamento.

3.5 Quantificação de Prolina

A determinação da concentração de prolina na parte aérea foi realizada baseada em curva-padrão (Figura 2), conforme descrito por Bates (1973). Para análise de prolina, as partes aéreas dos explantes foram coletadas em três estádios ao longo do experimento: após 10 meses de crescimento lento; pré-aclimatização e após a aclimatização.

Foram coletados 100 mg de tecido, os quais foram congelados e macerados em N₂ líquido. A extração foi feita com adição de 2 mL de ácido sulfosalicílico (10%) e, em seguida, o extrato foi centrifugado (10.000 rpm) por 10 min. Foram coletados 2 mL do centrifugado e acrescentados 2 mL da solução de ácido nítrico (1,25 g de nítrina; 30 mL de ácido acético glacial; 20 mL de ácido fosfórico 6M) e 2 mL de ácido acético glacial em tubos de ensaio com tampas de rosca de 15mL. As amostras foram então incubadas em banho-maria a 100 °C por 1 h e, em seguida, transferidas para banho de gelo, onde permaneceram por 10 minutos para pausar a reação. Após incubação, as amostras foram acrescidas de 4 mL de tolueno e homogeneizadas por 20 s para completa extração da prolina. O sobrenadante foi utilizado para determinação da concentração de prolina por espectrofotometria (520 nm).

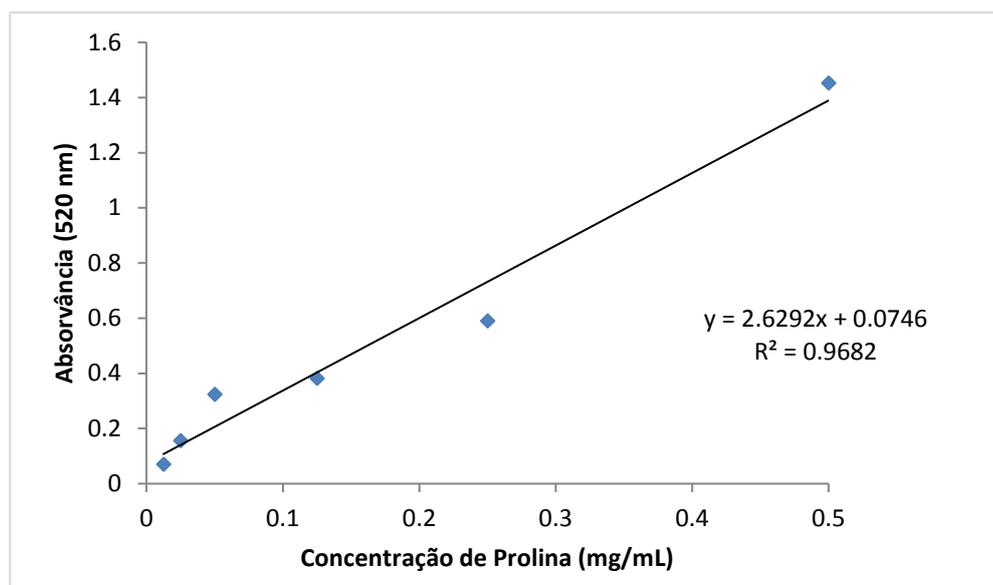


Figura 2. Curva Padrão para quantificação de prolina. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2016.

3.6 Análise estatística

Os dados de sobrevivência entre as cultivares foram submetidos à análise de variância, utilizando o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2011), sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, e para as variáveis analisadas no período de crescimento lento foi realizada comparação entre as médias por regressão polinomial, exceto a comparação de média de sobrevivência entre as cultivares.

4 Resultados e Discussão

4.1 Efeito da sacarose e do manitol na conservação in vitro de amoreira

Um dos aspectos mais importantes na conservação in vitro é a manutenção da viabilidade das plantas após o período de incubação. A redução do metabolismo precisa vir acompanhada desta para garantir seu posterior resgate e cumprir dessa forma o objetivo a qual se destina.

Considerando os resultados obtidos, é fundamental adequar as concentrações de substâncias com potencial osmorregulador a fim de promover o crescimento lento e possibilitar a recuperação de explantes após o período de conservação *in vitro* proposto.

A sobrevivência dos explantes da cultivar ‘Guarani’ após 10 meses de conservação *in vitro* foi superior nos tratamentos com presença de menores concentrações de manitol (10 e 20 g L⁻¹) combinadas com sacarose ou não, e nos tratamentos com a presença de sacarose isoladamente. Já nos tratamentos contendo maior concentração de manitol (30 g L⁻¹) combinado ou não com sacarose foi possível observar um menor percentual de explantes sobreviventes (Figura 3).

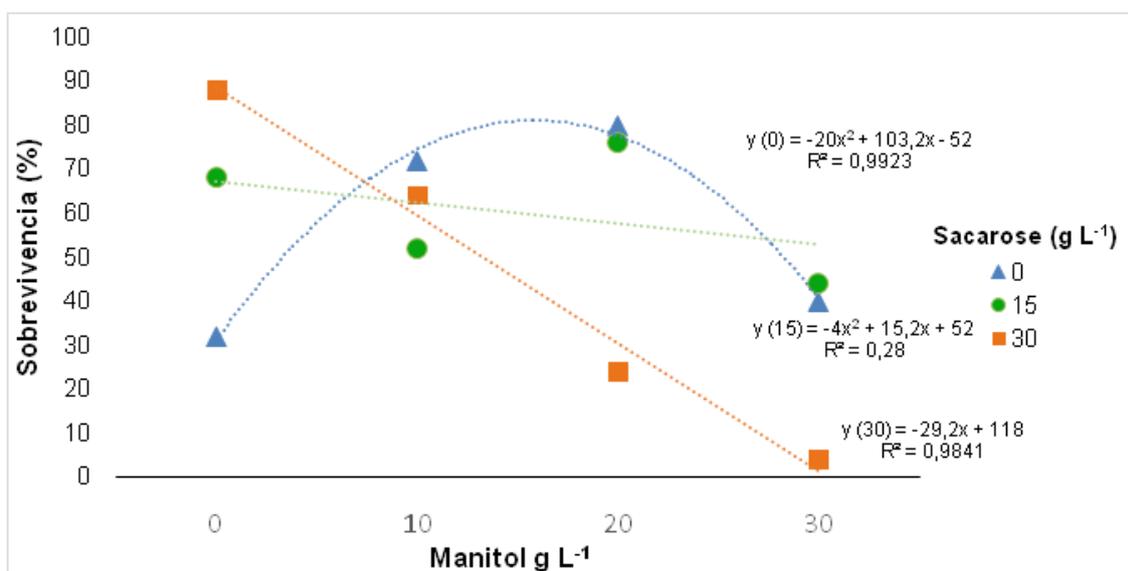


Figura 3. Percentual de sobrevivência dos explantes de amoreira preta ‘Guarani’ após 10 meses de conservação *in vitro*, em meio com adição de reguladores osmóticos. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2016.

A alta concentração de açúcares pode ocasionar efeitos nocivos tais como a diminuição da absorção de água, sais minerais, e assim afetar no crescimento e sobrevivência das plântulas (FRÁGUAS et al. 2003; BESSON et al. 2010), pois concentrações excessivas de açúcares alteram o potencial hídrico do meio de cultura (PAIVA-NETO; OTONI, 2003). Efeitos tóxicos devido a altas concentrações de reguladores osmóticos foram relatados por Lédo et al. (2007) e Sá et al. (2011) em coqueiro e mangabeira, respectivamente. Em

trabalho de Lemos et al. (2002) com cana de açúcar (*Saccharum* sp.) foi observado que os explantes dos tratamentos com apenas sacarose apresentaram maior viabilidade que aqueles dos tratamentos onde se misturou sacarose com manitol ou sorbitol.

A adição de 30 g L⁻¹ de sacarose combinada com 10 g L⁻¹ de manitol mostrou-se eficiente para a manutenção da cultivar 'Tupy' no período de crescimento lento, com um percentual de sobrevivência de 64% (Figura 4).

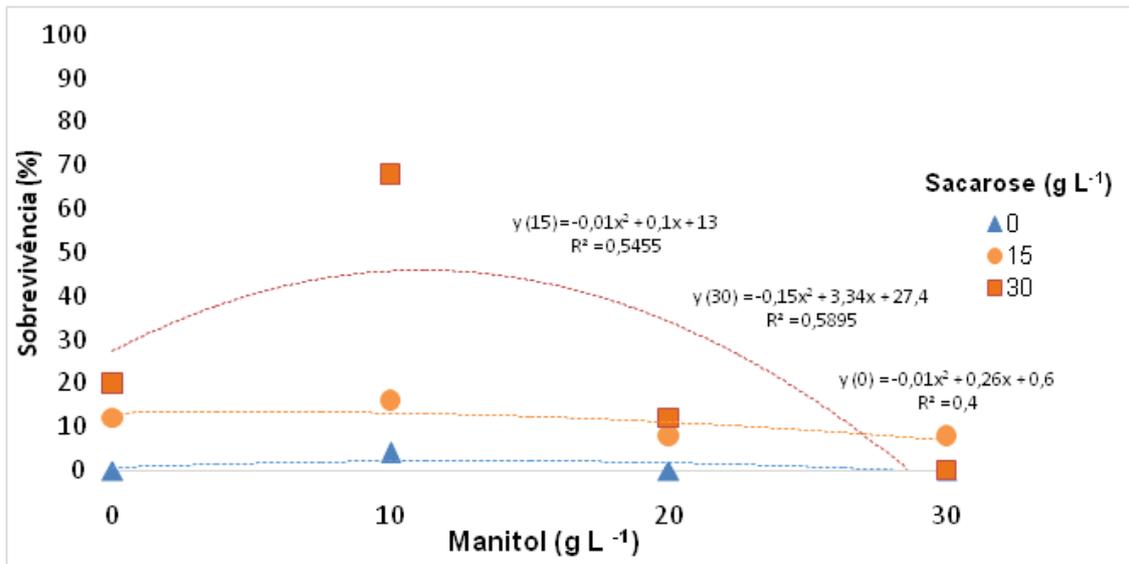


Figura 4. Percentual de sobrevivência dos explantes de amoreira preta 'Tupy' após 10 meses de conservação in vitro, em meio com adição de reguladores osmóticos. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2016.

Comparando a sobrevivência dos explantes entre as cultivares testadas após 10 meses em meio de crescimento lento, houve interação entre os fatores estudados. Para ambas as cultivares, verificou-se que no tratamento contendo 30 g L⁻¹ sacarose + 30 g L⁻¹ manitol, houve baixa taxa de sobrevivência, ressaltando novamente os efeitos deletérios da alta concentração de açúcares no meio (Figura 5). Já a combinação de 30 g L⁻¹ sacarose + 10 g L⁻¹ manitol se mostrou eficiente para manutenção dos explantes das cultivares 'Tupy' e 'Guarani', sendo a taxa de sobrevivência de 68% e 64% respectivamente.

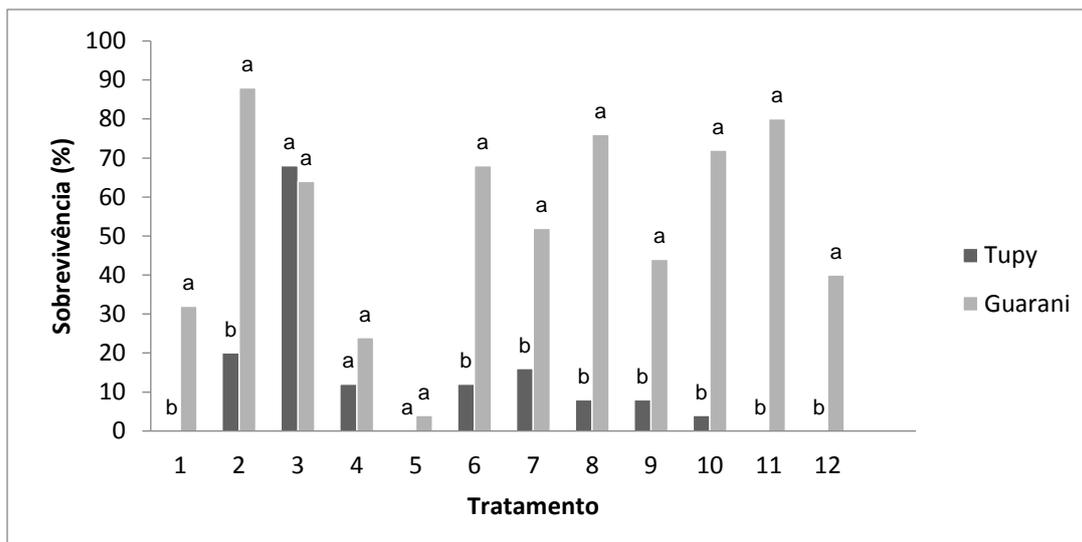


Figura 5. Percentual de sobrevivência dos explantes de amoreira preta, cvs. 'Tupy' e 'Guarani', após 10 meses de conservação in vitro. T1: 0 g L⁻¹ sacarose + 0 g L⁻¹ manitol; T2: 30 g L⁻¹ sacarose + 0 g L⁻¹ manitol; T3: 30 g L⁻¹ sacarose + 10 g L⁻¹ manitol; T4: 30 g L⁻¹ sacarose + 20 g L⁻¹ manitol; T5: 30 g L⁻¹ sacarose + 30 g L⁻¹ manitol; T6: 15 g L⁻¹ sacarose + 0 g L⁻¹ manitol; T7: 15 g L⁻¹ sacarose + 10 g L⁻¹ manitol; T8: 15 g L⁻¹ sacarose + 20 g L⁻¹ manitol; T9: 15 g L⁻¹ sacarose + 30 g L⁻¹ manitol; T10: 0 g L⁻¹ sacarose + 10 g L⁻¹ manitol; T11: 0 g L⁻¹ sacarose + 20 g L⁻¹ manitol; T12: 0 g L⁻¹ sacarose + 30 g L⁻¹ manitol. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2016.

Devido aos explantes de amoreira-preta 'Tupy' terem apresentado porcentagem de sobrevivência bastante baixa após 10 meses em meio de crescimento lento, as análises a seguir foram realizadas apenas com a cultivar Guarani.

O comprimento das brotações foi significativamente maior no tratamento utilizando sacarose isoladamente (35,31 mm), todavia quando outro agente osmótico esteve presente o mesmo comportamento não pode ser confirmado, o que evidencia a influência mútua dos agentes na redução do crescimento dos brotos (Figura 6).

Houve redução no comprimento quando o meio de cultura foi acrescido com maiores concentrações de agentes osmóticos ou quando estes não foram adicionados. Corroborando os resultados encontrados por Lima-Brito et al. (2001), com *Syngonanthus mucugensis*, foi observado que nos tratamentos suplementados com a combinação de sacarose e manitol, houve redução do comprimento da parte aérea à medida do aumento na concentração total de carboidratos no meio a 25°C de temperatura. No entanto, a alta concentração

de carboidratos no meio não é indicada para a conservação in vitro de amoreira-preta, visto que reduziu a viabilidade das plantas.

Segundo Vieira (2013), os osmorreguladores possuem a ação de reduzir a capacidade da planta de retirar água do meio de cultura, retardando seu crescimento. Quando não havia a presença de sacarose no meio de cultura, as taxas de crescimento foram significativamente menores (Figura 6). De fato, outros estudos também relatam que a adição de sacarose tem efeito benéfico no crescimento e desenvolvimento de plantas in vitro (FORTES; PEREIRA, 2001; FARIA et al., 2006; FLORES et al., 2013).

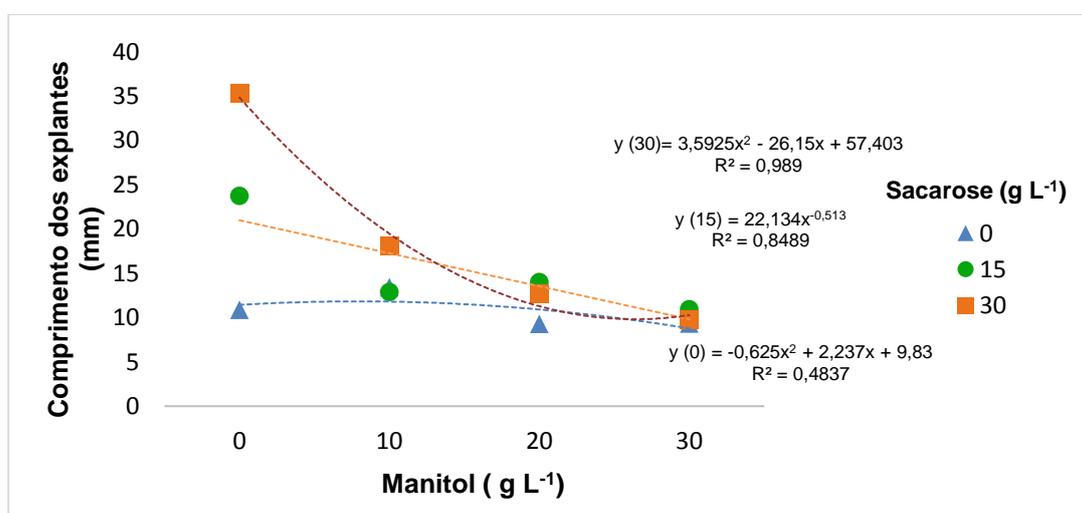


Figura 6. Comprimento das brotações de amoreira preta, cv. 'Guarani', após 10 meses de conservação in vitro. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2016.

Lédo et al. (2007), observaram que a adição de manitol a 24,65 e 32,87 mg L⁻¹ induziu menor crescimento de explantes de coqueiro anão verde. Em hastes de batata (*Solanum tuberosum*), a presença de manitol reduziu efetivamente o crescimento das plantas, porém apenas 37% dos explantes sobreviveram após 90 dias de cultivo (FORTES; PEREIRA, 2001). Contudo, estes resultados diferem dos encontrados em mangabeira, cujo manitol não foi viável para a conservação in vitro de microestacas desta espécie, uma vez que apresentou efeito tóxico (SÁ et al., 2011).

Nos tratamentos utilizando sacarose isoladamente foi verificado um maior crescimento dos explantes (Figura 7A), o que evidencia que a sacarose

promove aumento de biomassa e sua concentração é um fator determinante no crescimento de plantas em condições *in vitro* (ANKITA; ANIMESH, 2013).

O manitol é um açúcar geralmente não metabolizado pelas plantas e por isso utilizado para a redução do potencial hídrico do meio de cultura na conservação *in vitro* (ARRIGONI-BLANK et al., 2014). A alta concentração de manitol (30 g L^{-1}) no meio de cultura se mostrou eficiente para a redução do comprimento dos explantes de amoreira-preta 'Guarani' durante a conservação *in vitro* (Figura 7B).

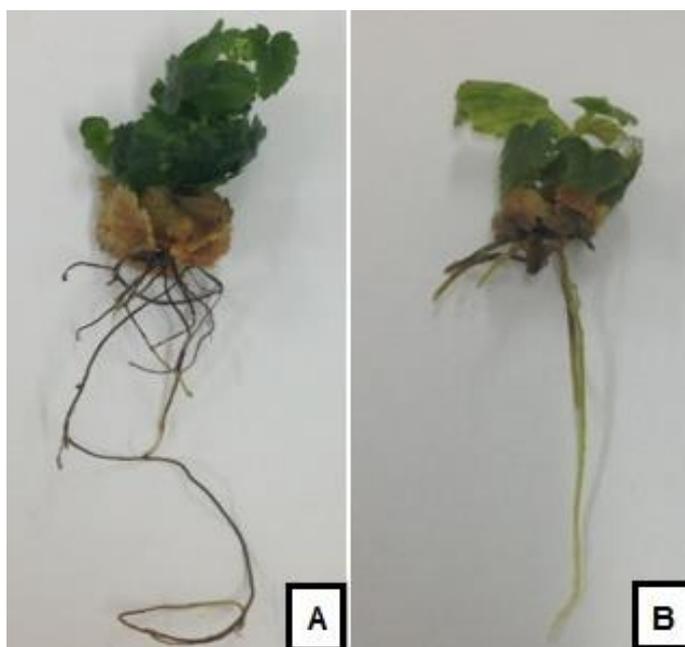


Figura 7. Aspecto das plantas de amoreira-preta 'Guarani' após 10 meses de conservação *in vitro*. (A) Tratamento 30 g L^{-1} sacarose + 0 g L^{-1} manitol; (B) Tratamento com 0 g L^{-1} sacarose + 30 g L^{-1} manitol. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2016.

O desenvolvimento *in vitro* de um sistema radicular funcional e com superfície de absorção compatível com a parte aérea é fundamental para a recuperação das plantas após o período proposto de conservação. Houve redução do número de plantas que apresentaram formação do sistema radicular quando o meio de cultura foi acrescido com maiores concentrações de agentes osmóticos ou quando estes não foram adicionados (Figura 8).

Calvete et al. (2002) observaram que em morango a biomassa do sistema radicular teve aumento crescente até a concentração de 45 g L^{-1} de sacarose, concentrações acima desta provocaram diminuição na biomassa e

na ausência do carboidrato não houve formação de raízes. A concentração de sacarose recomendada para a propagação in vitro de rosáceas como pêra, pêsego, maçã e amoreira-preta é 30 g L⁻¹ (DANTAS et al., 2002; RADMANN et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2004; DUTRA et al., 2010).

De acordo com Rolland et al. (2006) as fontes de carbono são essenciais para a produção de hormônios de crescimento, como as auxinas, que são capazes de induzir o desenvolvimento do sistema radicular. No entanto, a concentração de hidratos de carbono necessária para produzir auxinas varia conforme a espécie, sendo que altas concentrações de açúcar podem levar à redução do potencial osmótico do meio de cultura, resultando na diminuição da disponibilidade de água para as plantas, dificultando, assim, o seu crescimento (CALVETE et al., 2002).

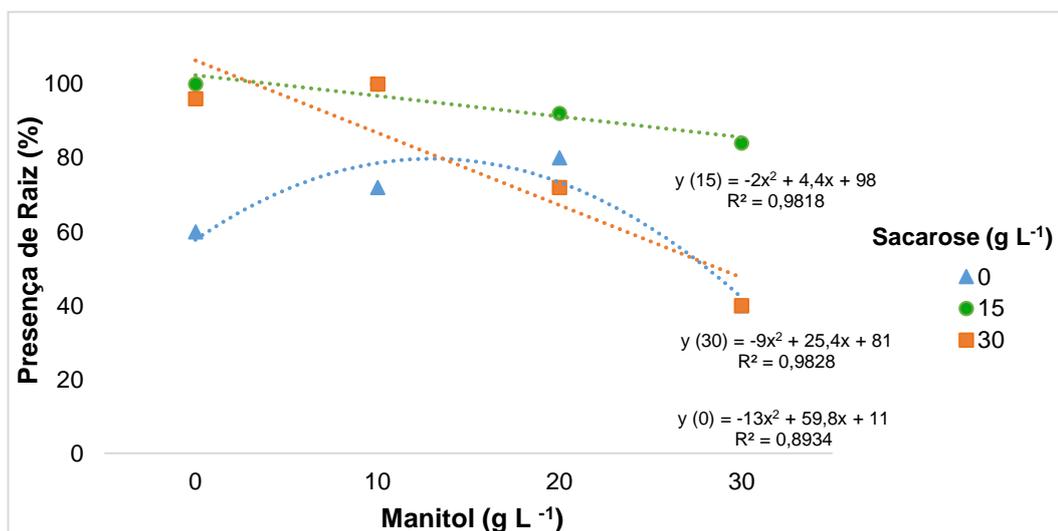


Figura 8. Percentual de plantas de amoreira preta cv. 'Guarani' enraizadas após 10 meses de conservação in vitro. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2016.

Segundo Carvalho et al. (2011), a taxa de multiplicação é o número de propágulos obtidos a partir de um explante inicial, em um determinado período de tempo. Para a cultivar 'Guarani', diferentemente do crescimento dos explantes onde observou-se que o aumento da concentração de manitol reduziu o comprimento, na taxa de multiplicação in vitro, a presença de manitol no meio proporcionou aumento na taxa de multiplicação.

A taxa de multiplicação encontrada, para ambas as cultivares, em todos os tratamentos com adição de reguladores osmóticos ao meio de cultura foi inferior à descrita para a espécie, em torno de cinco a sete explantes por

repicagem a cada 30 dias de cultivo (DUTRA et al., 2010), o que indica que os resultados foram satisfatórios. Sendo assim, os agentes osmóticos como a sacarose e o manitol podem ser acrescentados ao meio de cultura para auxiliar na redução da taxa de multiplicados, visto que os mesmos agem de forma a reduzir o potencial hídrico do meio de cultura alterando o crescimento dos explantes (LIMA-BRITO et al., 2011).

Resultados obtidos por Silva et al. (2016), demonstram que houve redução da taxa de multiplicação de amoreira-preta em função da presença do manitol no meio de cultura, fato que pode ter ocorrido devido a este ser um açúcar-álcool que geralmente não é metabolizado pelas plantas e por isso é empregado para a redução do potencial hídrico do meio de cultura na conservação *in vitro* (ARRIGONI-BLANK et al., 2014)

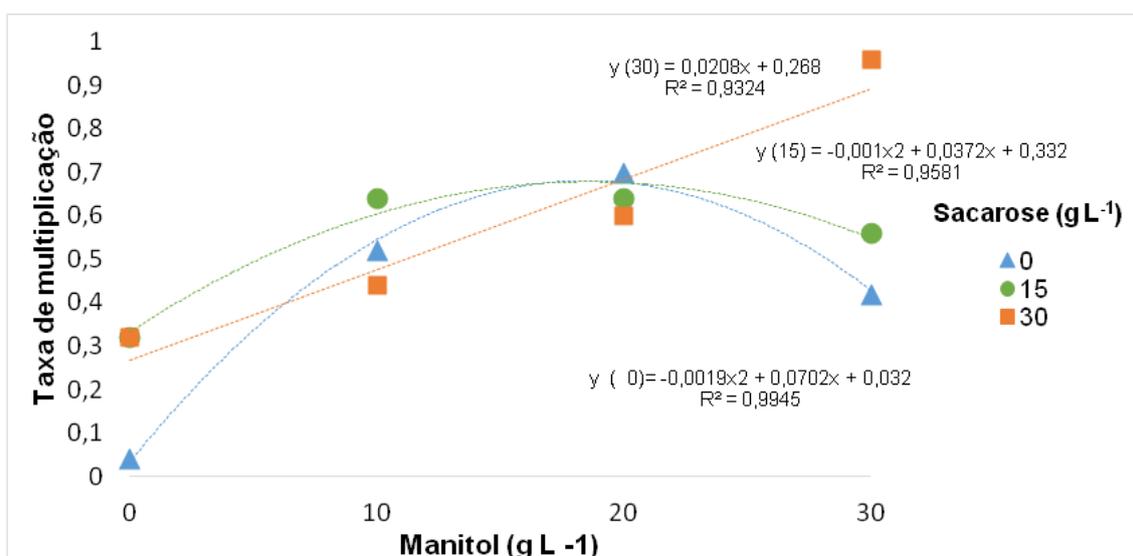


Figura 9. Taxa de multiplicação de explantes de amoreira-preta, cv 'Guarani', após 10 meses de crescimento lento. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2016.

As células e tecidos *in vitro* normalmente requerem um carboidrato para suprir suas demandas energéticas, sendo a sacarose, a fonte de carbono mais amplamente utilizada *in vitro* (MALDANER et al., 2006). A sacarose influencia fortemente o potencial morfogênico na maioria das espécies (AL-KHATEEB, 2008), estimulando o desenvolvimento das plantas até uma determinada concentração, onde o crescimento e as respostas fisiológicas modificam-se em função do potencial osmótico do meio. Sendo assim, segundo Marino et al.

(2010), a sacarose tem duplo papel na regulação da organogênese, atuando como fonte de energia/carbono e como osmorregulador.

O teor de umidade foi significativamente maior no tratamento onde não houve adição de reguladores osmóticos ao meio de cultura (Tabela 2). Reforçando o conceito de que quando os reguladores osmóticos, neste caso a sacarose e o manitol, são inseridos no meio de cultura, ocorre diminuição no potencial hídrico, reduzindo a absorção de água e nutrientes pelos explantes, removendo o excesso de água intracelular por gradiente osmótico (MARINO et al., 2010; SILVA; SCHERWINSKY-PEREIRA, 2011).

Foi observado um maior aumento na biomassa dos explantes nos tratamentos com adição de sacarose isoladamente, 30 g L⁻¹ sacarose + 10 g L⁻¹ manitol, 15 g L⁻¹ sacarose + 20 g L⁻¹ manitol e 0 g L⁻¹ sacarose + 10 g L⁻¹ manitol (Tabela 2). A diminuição de massa seca na parte aérea está relacionada com a falta de água para o metabolismo, o que reduz a velocidade das reações metabólicas e, conseqüentemente, diminui o acúmulo de matéria seca (MARUR et al., 1994).

Tabela 2. Massa fresca e seca de brotos (g) e teor de umidade (%) de amoreira-preta, cv. Guarani, após 10 meses em cultivo in vitro com diferentes agentes osmóticos. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2016.

Sacarose (g L ⁻¹)	Manitol (g L ⁻¹)	Umidade (%)	Massa fresca de brotos(g)	Massa seca de brotos(g)	Prolina (mM g ⁻¹)
0	0	99,96 a	0,03 b	0,00 b	-
30	0	80,10 b	0,24 ab	0,05 b	2,07 a
30	10	76,14bc	0,43 ab	0,11ab	2,95 a
30	20	-	-	-	-
30	30	-	-	-	-
15	0	80,97bc	0,27 ab	0,05 b	14,12 d
15	10	72,83bc	0,10 b	0,03 b	16,67 d
15	20	79,20bc	0,54 a	0,27 a	37,84 e
15	30	69,29 c	0,09 b	0,03 b	7,30 b
0	10	83,58bc	0,23 ab	0,04 b	9,12 c
0	20	75,24bc	0,07 b	0,02 b	10,86 c
0	30	89,90 b	0,04 b	0,01 b	-
C.V.		7,48%	68,19%	69,27%	4,6%

- Não houve sobreviventes no período ou as amostras foram insuficientes para esta análise destrutiva.

Médias seguidas de letras iguais, não diferiram significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Quanto ao acúmulo de prolina na parte aérea, foi verificado que para amoreira-preta, cv. 'Tupy', a concentração de prolina foi significativamente menor nos tratamentos com presença de sacarose isoladamente e quando combinada com baixa concentração de manitol (10 g.L^{-1}) (Tabela 2). Ambos os tratamentos também apresentaram boa taxa de sobrevivência no período, evidenciando que quando em condições adversas de crescimento, vários mecanismos de proteção são ativados nas plantas.

O ajuste osmótico constitui-se em um dos mecanismos fisiológicos mais eficazes para manutenção da turgescência celular, sob condições de baixo potencial hídrico (MARIJUAN; BOSCH, 2013). Este se estabelece mediante o acúmulo, no vacúolo ou no citosol, de solutos compatíveis, como a prolina, que contribuem para a manutenção do equilíbrio hídrico e a preservação da integridade de proteínas, enzimas e membranas celulares (ASHRAF et al., 2011; MARIJUAN; BOSCH, 2013).

4.2 Retomada do crescimento dos explantes provenientes de meio com reguladores osmóticos

Os reguladores osmóticos têm sido bastante usados na conservação *in vitro*, devido a sua capacidade de controlar o potencial osmótico do meio. Esse efeito, entretanto, ainda que reduza o metabolismo das plantas conservadas devido ao déficit hídrico, pode causar um estresse elevado, podendo comprometer a integridade das plantas conservadas. Tendo em vista este problema, é necessário o ajuste de uma concentração ideal, considerando a manutenção da capacidade regenerativa das plantas (MACIA, 2011), pois além da sobrevivência e manutenção de níveis modulados de crescimento, o sucesso da conservação via uso de osmorreguladores para promoção de crescimento lento está baseado na possibilidade de recuperação do maior número de plantas.

A sobrevivência após o período de recultivo foi aceitável na maioria dos tratamentos (acima de 60%), apenas quando os explantes vieram de tratamento contendo 15 g.L^{-1} de manitol + 10 g.L^{-1} de sacarose (14,3%) e 15 g.L^{-1} de manitol + 10 g.L^{-1} de sacarose (50%) a sobrevivência foi inferior (Tabela 3).

Decorridos 45 dias em meio para retomada do crescimento, observou-se que a taxa de multiplicação de amoreira-preta mantida em tratamento com sacarose isoladamente, retornou às taxas obtidas comumente (Tabela 3), considerando que a taxa de multiplicação da amora-preta *in vitro* varia em torno de cinco a sete explantes por repicagem (DUTRA et al., 2010). Este resultado indica que mesmo após o período de manutenção dos explantes em meio com reguladores osmóticos, aqueles mantidos em meio com adição de manitol obtiveram maior dificuldade de retomar sua taxa de multiplicação.

De acordo com Sarkar e Naik (1998) a adição de 2-4% de manitol poderia aumentar a sobrevivência de germoplasma vegetal, contudo, outros autores como Srivastava et al. (2013) e Engelmann (2011) sugerem que há diminuição na altura e sobrevivência das plantas no incremento das concentrações de manitol e sorbitol. Portanto, no presente trabalho pode-se inferir que as concentrações dos agentes osmóticos não foram diretamente prejudiciais ao crescimento, mas que quando adicionada alta concentração de reguladores osmóticos ao meio (30 g L^{-1} sacarose + 30 g L^{-1} manitol), devido haver baixa sobrevivência dos explantes após 10 meses de cultivo, foi observada redução do número de mudas obtidas após o período de crescimento lento (Tabela 3).

Quanto às variações entre os tratamentos, essas diferenças constatadas em relação à altura dos explantes se explicam porque estes vieram com diferentes tamanhos do experimento anterior, conforme apresentado na figura 6. Novamente os explantes provenientes do meio de cultura com adição de 30 g.L^{-1} de sacarose apresentaram o maior comprimento das brotações, diferindo estatisticamente dos demais. Já o menor comprimento foi observado quando o meio de crescimento lento foi acrescido apenas com 20 g.L^{-1} ou 30 g.L^{-1} de manitol (Tabela 3).

Tabela 3. Análise da sobrevivência, comprimento das brotações e da taxa de multiplicação na retomada do crescimento dos explantes de amora-preta, cv. 'Guarani', após 10 meses de crescimento lento. NMO: número de mudas obtidas. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2016.

Sacarose (g L ⁻¹)	Manitol (g L ⁻¹)	NMO	Sobrevivência (%)	Comprimento das brotações (mm)	Taxa de Multiplicação	Prolina (mM g ⁻¹)
0	0	6	83,3ab	11,31 e	2,7 c	-
30	0	6	100 a	28,81 a	7,5 a	0,37 a
30	10	8	75,0ab	16,36 c	3,5 c	0,40 a
30	20	9	50,0bc	15,12cd	3,1 c	-
30	30	2	100 a	19,27 b	2,5 c	-
15	0	4	100 a	17,72 c	5,8 b	0,58 a
15	10	7	14,3 c	10,45 de	0,3 d	1,01 ab
15	20	6	66,7ab	14,25 d	3,5 c	0,21 a
15	30	8	75,0ab	16,24 c	4,0 c	1,58 bc
0	10	6	83,3ab	15,56cd	3,3 c	2,05 c
0	20	7	85,7ab	9,79 f	1,4 d	1,74 bc
0	30	6	66,7ab	9,07ef	1,8 d	-
C.V.			19,73%	3,06%	24,14%	4,6%

Médias seguidas de letras iguais, não diferiram significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Segundo Orlikowska; Kucharska (2009), a prolina pode ser utilizada como um marcador para espécies de *Rubus*, pois há o acúmulo de prolina em relação ao estresse, podendo variar conforme o tipo de estresse aplicado no meio e o genótipo.

Não houve regularidade quanto ao acúmulo de prolina no período pré-aclimatização, explantes oriundos de meio de cultura com presença de manitol isoladamente ou com a presença de 15 g.L⁻¹ de sacarose + 30 g.L⁻¹ de manitol apresentaram maior acúmulo de prolina nos tecidos.

4.3 Enraizamento e aclimação dos explantes provenientes de meio com reguladores osmóticos

Os resultados obtidos durante a fase de enraizamento evidenciam a importância das auxinas nesta fase, visto que a maior taxa de enraizamento ocorreu in vitro, com adição de ANA ao meio de cultura. Estes resultados estão de acordo com trabalhos encontrados na literatura, que apontam a necessidade da inclusão de uma auxina nos meios de enraizamento de espécies frutíferas, como ameixeira cv. Santa Rosa (MAGALHÃES; PETERS, 1991), pereira cv. Carrick (LEITE et al., 1994) e macieira cv. Fred Hough (CENTELLAS et al., 1999).

Em relação ao comprimento da maior raiz e a sobrevivência dos explantes enraizados *in vitro*, não foi observada diferença significativa para a cultivar 'Tupy'. O maior número de raízes para esta cultivar, foi observado nos explantes proveniente dos tratamentos com utilização de sacarose isoladamente (Tabela 4). Segundo Nemeth (1986) as concentrações de sacarose estariam associadas em manter os níveis endógenos de hormônios.

Tabela 4. Análise da sobrevivência, comprimento da raiz e número de raízes formadas de explantes de amoreira-preta, cv. 'Tupy', após 45 dias em meio de enraizamento. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2016.

Sacarose (g L ⁻¹)	Manitol (g L ⁻¹)	Sobrevivência (%)	Comprimento da raiz (mm)	Número de raiz
0	0	-	-	-
30	0	100 a	33,8 a	6,4ab
30	10	94,1 a	28,9 a	5,2 b
30	20	-	-	-
30	30	-	-	-
15	0	100 a	41,86 a	10,5 a
15	10	-	-	-
15	20	-	-	-
15	30	88,9 a	32,2 a	4,8 b
0	10	-	-	-
0	20	-	-	-
0	30	-	-	-
C.V.		39,47%	37,45%	49,12%

- não houve sobreviventes no período

Médias seguidas de letras iguais, não diferiram significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Alguns autores sugerem que a citocinina BAP no meio de cultura de multiplicação poderia ter efeito residual prejudicial à formação de raízes (ASSIS; TEIXEIRA, 1998). No entanto, pôde-se observar que neste trabalho houve taxa bastante alta de enraizamento o que não indica nenhuma interferência negativa do BAP que estava no meio de cultivo anterior ao enraizamento (Tabela 4 e 5).

No presente trabalho, além do tradicional enraizamento *in vitro* utilizado para amoreira-preta foi testado o enraizamento *ex vitro*, pois além da redução dos custos, há melhoria na qualidade do sistema radicular formado na planta. Este se forma mais completo e funcional, com maior número de raízes

secundárias, sem a formação intermediária de calo, que dificulta a conexão do sistema vascular entre caule e raiz (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Foi possível observar que apesar da baixa sobrevivência das plântulas no enraizamento ex vitro, houve enraizamento dos explantes (Tabela 5). Augusto (2001) obteve taxas de enraizamento de 95% (com imersão em AIB) e de 100% (sem imersão em AIB) para amoreira-preta 'Brazos', além disso, também foi observado que o comprimento de raízes, número de folhas por plântula e a altura das plântulas não diferiram estatisticamente. Sendo assim, pode-se constatar que não é necessária a utilização de AIB para o enraizamento ex vitro de amoreira-preta.

Tabela 5. Análise da sobrevivência, comprimento da raiz e da parte aérea e número de raízes formadas de explantes de amoreira-preta, cv. 'Guarani', após 45 dias no estádio de enraizamento in vitro e ex vitro. Embrapa Clima Temperado, Pelotas 2016.

Sacarose (g L ⁻¹)	Manitol (g L ⁻¹)	Número de raiz		Sobrevivência (%)		Comprimento da raiz (mm)		Comprimento da parte aérea (mm)	
		In vitro	Ex vitro	In vitro	Ex vitro	In vitro ^{ns}	Ex vitro	In vitro ^{ns}	Ex vitro
0	0	10,0a	0,0 c	100 a	0,0 c	19,70,0 g		16,90,0 e	
30	0	4,9c	1,2 bc	86 b	60,0 b	18,36,1 ef		14,9 9,7 c	
30	10	5,5bc	1,5 abc	100 a	60,0 b	19,85,1 f		15,89,4 c	
30	20	4,3c	3,0 ab	100a	14,2 c	25,6 19,8 a		16,4	12,6 b
30	30	-	-	--		--		-	-
15	0	4,7 c	1,3 abc	100 a	28,6 c	21,38,1d		14,67,2 d	
15	10	6,3 abc	0,0 c	100 a	100 a	20,60,0 g		12,10,0 e	
15	20	7,7 abc	4,0 a	100 a	11,1c	16,98,4 cd		14,8 6,8 a	
15	30	7,3 abc	1,2bc	100 a	25,0 c	19,37,8 de		16,65,7 d	
0	10	9,0 ab	2,3 abc	100 a	20,0 c	23,610,1c		19,89,7 c	
0	20	6,0 bc	4,0 a	100 a	20,0 c	26,711,7 b		18,713,2 b	
0	30	6,0 bc	0,0 c	100a	0,0 c	9,50,0 g		13,9	0,0 e
C.V.		20,4	55,2	1,5	31,4	16,3	8,4	8,9	7,12

- não houve sobreviventes no período

^{ns} não significativo pelo teste Tukey a 0,05 de significância

Médias seguidas de letras iguais, não diferiram significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Não houve diferença significativa entre os tratamentos para o comprimento da parte aérea dos explantes enraizados in vitro, porém, no geral, este foi superior aos explantes mantidos ex vitro (Tabela 5). Quanto a estas variações entre os tratamentos, essas diferenças constatadas em relação à altura das plântulas se explicam porque as micro-estacas vieram com

diferentes tamanhos do experimento anterior, conforme apresentado no item 5.2. Mesmo assim, pode-se observar no enraizamento in vitro um comportamento bastante homogêneo (Tabela 5), indicando que as diferenças observadas nesta avaliação poderiam ser dissipadas na continuação do crescimento das mudas.

Em trabalho realizado por Augusto (2001) foi observado que o enraizamento ex vitro pode ser realizado com sucesso para amoreira-preta, reduzindo uma etapa do processo de micropropagação, ao combinar numa só fase o enraizamento e a aclimação, reduzindo o tempo e os custos de todo o processo. O mesmo resultado não pode ser observado em nosso experimento, o que pode ter ocorrido pelo fato desta etapa ter sido realizada nos meses de inverno, acarretando em uma maior dificuldade das plântulas se adaptarem ao ambiente ex vitro.

O aspecto do enraizamento in vitro e ex vitro das micro-estacas pode ser observado na Figura 10.



Figura 10. Plantas de amoreira-preta, cv. 'Guarani', após 45 dias de enraizamento (A) ex vitro e (B) in vitro. Embrapa Clima Temperado, Pelotas 2016.

As plantas de amoreira-preta enraizadas in vitro quando aclimatizadas apresentaram 100% de sobrevivência, após 30 dias de permanência em casa de vegetação, independente da cultivar testada. Sendo que estas permaneceram em túnel plástico no período de aclimatização, para manter a umidade. De acordo com George (1993), é necessária uma alta umidade e

proteção para os primeiros estágios de aclimação das plantas ao ambiente ex vitro. O autor sugere que um mínimo de 85% de umidade relativa do ar seja mantido durante algumas semanas.

No período pré-aclimação, explantes oriundos de meio de cultura com presença de manitol isoladamente ou com a presença de 15 g.L⁻¹ de sacarose + 30 g.L⁻¹ de manitol apresentaram maior acúmulo de prolina nos tecidos (Tabela 6).

Na avaliação da quantificação de prolina acumulada após a aclimação, não houve diferença significativa entre os tratamentos. A prolina, um aminoácido acumulado em plantas submetidas a diferentes tipos de estresse, pode ser utilizado, após o término do período de estresse, como fonte de energia e de esqueletos de carbono e nitrogênio, para recuperação mais rápida do tecido vegetal (ASPINALL; PALEG, 1981).

Tabela 6. Concentração de prolina em amora-preta, cv. 'Tupy' após a aclimação. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2016.

Sacarose (g L ⁻¹)	Manitol (g L ⁻¹)	Prolina (mM g ⁻¹) ^{ns}
0	0	-
30	0	0,587
30	10	0,814
30	20	-
30	30	-
15	0	0,224
15	10	1,083
15	20	0,038
15	30	0,302
0	10	0,119
0	20	0,000
0	30	-

- não houve sobreviventes no período ou as amostras foram insuficientes para esta análise destrutiva

^{ns} não significativo pelo teste Tukey a 0,05 de significância
Médias seguidas de letras iguais, não diferiram significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. CV:4,6

5 Conclusões

A partir do presente trabalho é possível concluir que é viável a manutenção das cultivares de amoreira-preta Tupy e Guarani, em condições de crescimento lento em sala de crescimento com temperatura de 25°C por 10 meses, não sendo necessária a adição de manitol ao meio de cultura.

6 Considerações Finais

A cultura de tecidos auxilia na conservação de material genético por meio da conservação *in vitro*, seja por meio do crescimento lento ou da criopreservação.

Ao longo das pesquisas realizadas, com crescimento lento, foi possível verificar que as cultivares estudadas (Tupy e Guarani) responderam diferentemente quanto às condições de cultivo testadas. Neste sentido, sugere-se a realização de testes com outras cultivares a fim de avaliar se o componente genético é preponderante.

O período de crescimento lento testado durante o experimento foi de 10 meses, sendo visto que a utilização de um regulador osmótico, como o manitol, foi desnecessária. Sendo assim, observou-se a possibilidade de testar um maior tempo de manutenção *in vitro*, além de outros reguladores osmóticos, como o sorbitol.

Além das variáveis analisadas, sugere-se que sejam feitas outras análises nos explantes, como a produção de espécies reativas de oxigênio, grau de oxidação e calogênese.

Este foi um dos trabalhos pioneiros no que se refere à conservação *in vitro* de amoreira-preta. Ressalta-se que a combinação do uso de reguladores osmóticos ou químicos com conservação em diferentes temperaturas pode ser uma estratégia bem-sucedida em novos estudos a serem realizados para se determinar as melhores condições de conservação com o uso de reguladores osmóticos ao meio de cultura.

7 Referências

ALIA, M. Molecular mechanisms of quenching of active oxygen species by proline. In: **1st Annual User Meeting of the Free Radical Research Facility Daresbury, at Council for the Central Laboratory of the Research Councils**. UK: Cheshire, 2003.

AL-KHATEEB, A. A. Regulation of in vitro bud formation of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Khanezi by different carbon sources. **Biore source technology**, n. 99, v.1, p. 6550-6555, 2008.

ANKITA, P.; ANIMESH, S. Effects of mannitol, sorbitol and sucrose on growth inhibition and in vitro conservation of germplasm of *Asparagus racemosus* an important medicinal plant. **Medicinal Plants International Journal of Phytomedicines and Related Industries**, v.5. p. 71-74, 2013.

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

ANTUNES, L.E.C. Amora-preta (*Rubus* spp). In: **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, SP, v. 28, n. 3, 2006.

ANTUNES, L. E. C., PEREIRA, J. F. M., PEREIRA, I. S., TREVISAN, R. Sistemas de produção de Amoreira-preta. **Sistemas de Produção**, v. 12, 2008.

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, n. 1, p. 100-111, 2014.

ARRIGONI-BLAANK, M. F. et al. *In vitro* conservation of sweet potato genotypes. **The Scientific World Journal**, v.1, n. 1, p.1-7, 2014.

ASHRAF, M.; AKRAM, N.A.; ALQURAINY, F.; FOOLAD, M.R. Drought tolerance: roles of organic osmolytes, growth regulators, and mineral nutrients. **Advances in Agronomy**, v.111, p.249-296, 2011.

ASPINALL, D.; PALEG, G. Proline accumulation; physiological aspects. In: Paleg, G e Aspinall, D. (eds). *The physiology and biochemistry of drought resistance in plants*. **Academic Press**, Sidney, p. 206-242, 1981.

ASSIS, T.F.; TEIXEIRA, S.L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, 1998. v.1, p.261-296.

AUGUSTO, C. S. S. **Micropropagação da amoreira-preta cv. Brazos**. 2001. 115 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2001.

BARTELS, D.; SUNKAR, R. Drought and salt tolerance in plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.24, n.1, p.23-58, 2005.

BATES, L.S. Rapid determination of free proline for water stress studies. **PlantSoil**, v.39, p.205-207, 1973.

BESSON, J.C.F.; OLIVEIRA, L.K.; BONETT, L.P.; STEFANELLO, S. Fontes e concentrações de carboidratos no crescimento vegetativo e no enraizamento *in vitro* de *Miltonia flavescens* Lindl. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 8, p. 9-13, 2010.

BRAY, E. A. Plant responses to water deficit. **Trend in Plants Science**, Kidlington, v. 2, p.48-54, 1997.

CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa. p.87-132, 1998.

CALVETE E. O.; KÄMPF A. N.; SUZIN M. Concentração de sacarose no enraizamento *in vitro* de morangueiro. **Horticultura Brasileira**, v. 20, n.1, p. 186-191, 2002.

CAMPAGNOLO, M.A.; PIO, R. Phenological and yield performance of black and redberry cultivars in western Paraná State. **Acta Scientiarum**. Agronomy, v.34, p.439-444, 2012a. DOI: 10.4025/actasciagron.v34i4.15528.

CAMPAGNOLO, M.A.; PIO, R. Poda drástica para a produção da amora-preta em regiões subtropicais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.47, p.934-938, 2012c.

CARVALHO, A. C. P. P.; TORRES, A. C.; BRAGA, E. J. B.; LEMOS, E.P. DE ; SOUZA, F. V. D. ; PETERS, J. A.; WILLADINO, LILIA; CÂMARA, T.R. Glossário de Cultura de Tecidos de Plantas. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v. 07, p. 30-60, 2011.

CASTRO, R.D.; HILHORST, H.W.M. **Embebição e reativação do metabolismo**. In: A.G. FERREIRA, F. BORGHETTI (eds.). Germinação: do básico ao aplicado. Porto Alegre, Artmed. 2004. p. 149-162.

CENTELLAS, A.Q.; FORTES, G.R. de L.; MÜLLER, N.T.G.; ZANOL, G.C.; FLORES, R.; GOTTINARI, R.A. Efeito de auxinas sintéticas no enraizamento *in vitro* de macieira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.34, n.2, p.181-186, 1999.

DANTAS, A.C.M. et al. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de cultivares de *Pyrus* spp. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.8, p. 19-23, 2002.

DELAUNEY, A.; VERMA, D. Proline biosynthesis and osmo regulation in plants. **Plant Journal**, v. 4, p. 215-223, 1993.

DONADIO, L. C. *Rubus spp.* **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n.1, p. 001, 2014.

DUMET, D. Importance of source for the acquisition of tolerance to desiccation and cryopreservation of oil palm somatic embryos. **Cryo-letters**, v.14, p. 243-250, 1993.

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. 23 p. 2010. (Documento 326).

ENGELMANN, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. **In vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, v. 47, p. 5-16, 2011.

FACHINELLO, J.C.; PASA, M. da S.; SCHMITZ, J.L.; BETEMPS, D.L. Situação e perspectivas da fruticultura de clima temperado no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.33, p.92-108, 2011.

FARIA, G. A.; COSTA, M. A. P. C.; JUNGHANS, T. G.; LEDO, C. A. S. Efeito da sacarose e do sorbitol na conservação *in vitro* de *Passiflora giberti* N. E. Brown. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.28, n.2, p.267-270, 2006.

FERREIRA, D.F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v.35, p.1039-1042, 2011.

FIGUEIREDO, M.A. de; PIO, R.; SILVA, T.C.; SILVA, K.N. Características florais e carpométricas e germinação *in vitro* de grãos de pólen de cultivares de amoreira-preta. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.48, p.731-740, 2013.

FLORES, R.; ULIANA, S.C.; PIMENTEL, N.; GARLET, T.M.B. Sacarose e sorbitol na conservação *in vitro* de *Puffia tuberosa* (Spreng) Hicken (Amaranthaceae). **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v.4, n.3, p.192-199, 2013.

FORTES, G.R.L.; PEREIRA, J.E.S. Preservação *in vitro* da batata com ácido acetil salicílico e duas fontes de carboidrato. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, n.10, p.1261-4, 2001.

FRÁGUAS, C.B.; VILLA, F.; SOUZA, A.V.; PASQUAL, M.; DUTRA, L.F. Crescimento *in vitro* de plântulas de orquídeas oriundas da hibridação entre *Cattleyalabiateae Laeliaitambana*. **Ceres**, 50: 719-726. 2003.

GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture**. Part. 1. The technology. 2.ed. Edington, Wilts, London: Exegetics, 1993. 1574p.

GIMENEZ, D. F. J. **Parâmetros biométricos, acúmulo de prolina e identificação de respostas moleculares, por Cdna-Aflp, ao estresse por**

déficit hídrico em cana-de-açúcar. 2011. 119 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2011.

GOPAL, J.; CHAUHAN, N.S., Slow growth in vitro conservation of potato germplasm at low temperature. **Potato Research**, v. 53, n.3, p.141–149, 2010.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, 1998. v.1, p.43-76.

GUEDES, M.N.S.; ABREU, C.M.P. de; MARO, L.A.C.; PIO, R.; ABREU, J.R.A.; OLIVEIRA, J.O. Chemical characterization and mineral levels in the fruits of blackberry cultivars grown in a tropical climate at an elevation. **Acta scientiarum.** Agronomy, v.35, p.191-196, 2013.

HARE, P. D.; CRESS, W. A.; VAN STADEN, J. Proline synthesis and degradation: a model system for elucidating stress-related signal transduction. **Journal of Experimental Botany** v. 50, p. 413-434, 1999.

HARTMANN, H. T., KESTER, D. E., DAVIES JUNIOR, F. T. **Plant propagation: principles and practices.** 5thed. Englewood Cliffs: Prentice-Hall, 1997. 647 p.

HASSAN, N.A.; BEKHEET, S.A. Midterm storage and genetic stability of strawberry tissue cultures. **Research Journal of Agriculture and Biological Sciences**, v. 4, n. 5, p. 505–511, 2008.

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

JENNINGS, D. L.; McNICOL, R. J. Rubus breeding: recent progress and problems. **Plant Breeding Abstracts**, Berlin, v. 61, p. 753-758, 1991.

LÉDO, A.S.; CUNHA, A. O.; ARAGÃO, W. M.; TUPINAMBÁ, E. A. Efeito da sacarose e do manitol na conservação *in vitro* por crescimento lento de coqueiro anão. **Magistra**, v.19, n.4, p.346-351, 2007.

KADOTA, M.; IMIZU, K.; HIRANO, T. Doubléphase in vitro culture using sorbitol increase shoot proliferation and hyperhydricity in Japanese pear. **Scientia Horticulturae**, v. 89, p.207-210. 2001

KAVI KISHOR, P. B.; SANGAM, S.; AMRUTHA, R. N.; SRI LAXMI, P.; NAIDU, K. R.; RAO, K. R. S. S.; RAO, S.; REDDY, K. J.; THERIAPPAN, P.; SREENIVASULU, N. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. **Current Science**, v. 88, n. 3, p. 424-438, 2005.

LEITE, D.L.; PETERS, J.A.; FORTES, G.R.de L.; NAKASU, B.H. Micropropagação de pereira (*Pyrus* spp.) cultivar Carrick. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal-SP, v.16, n.1, 236-241, 1994.

LEITZKE, L.N. et al. Multiplicação e enraizamento in vitro de amora-preta 'Xavante': efeito da concentração de sais, do tipo de explante e de carvão ativado no meio de cultura. **Ciência e Agrotecnologia**, v.33, Edição Especial, p.1959-1966, 2009.

LEITZKE, L. N., DAMIANI, C. R., SCHUCH, M.W. Meio de cultura, concentração de AIB e tempo de cultivo no enraizamento in vitro de amoreira-pretae framboeseira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 31:582-587. 2009.

LEMOES, E.E.P. et al. Conservação in vitro de germoplasma de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, n.10, p.1359-1364, 2002.

LIMA-BRITO, A.; ALBUQUERQUE, M. M. S.; ALVIM, B. F. M.; RESENDE, S. V.; BELLINTANI, M. C.; SANTANA, J. R. F. Agentes osmóticos e temperatura na conservação in vitro de sempre-viva. **Ciencia Rural**, Santa Maria, v. 41, n.8, p. 1354-1361, 2011.

LOPES-DELGADO, H.; JIMENEZ-CASAS, M.; SCOTT, I. M. Storage of potato microplants *in vitro* in the presence of acetyl salicylic acid. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 54, n. 3, p. 145-152, 1998.

MAGALHÃES JÚNIOR. A.; PETERS, J.A., Cultura in vitro de ameixeira: Efeito do ácido indolbutírico, tipo de lâmpada e intensidade luminosa no enraizamento. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina/PR, v.3, n.1, p.57-61, 1991.

MALDANER, J.; NICOLOSO, F.T.; SANTOS, E.S.; FLORES, R.; SKREBSKY, E.C. Sacarose e nitrogênio na multiplicação *in vitro* de *P. affia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **Ciência Rural**, v.36, n.4, p.1201-6, 2006.

MARIJUAN, M.P.; BOSCH, S.M. Ecophysiology of invasive plants: osmotic adjustment and antioxidants. **Trends in Plant Science**, v.18, p.660-666, 2013.

MARINO, G., NEGRI, P., CELLINI, A., MASIA, A. Effect of carbohydrates on *in vitro* low-temperature storage of shoot cultures of apricot. **Scientia Horticulturae**, v. 126, p. 434-440, 2010.

MARUR, C. J.; SODEK, L.; MAGALHÃES, A. C. Free aminoacids in leaves of cotton plants under water deficit. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campinas, v.6, p.103-108, 1994.

LOPEZ-DELGADO, H.; JIMENEZ-CASAS, M.; SCOTT, I. M. Storage of potato microplants in vitro in the presence of acetyl salicylic acid. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.54 p.145-152, 1998.

MACIA, R. J. **Conservação in vitro de cultivares de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz)**. 2011. 67f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Cruz das Almas.

MANSOUR, M. M. F. Protection of plasma membrane of onion epidermal cells by glycine betaine and proline against NaCl stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, Issles Molineaux, v. 36, n. 10, p.767-772, 1998.

MOLINARI, H. B. C. **Expressão Estresse-Induzida do Gene *P5CS* em Plantas transgênicas de Cana-de-açúcar submetidas ao déficit hídrico**. 2006. 124f. Tese (Doutorado em Agronomia na área de Produção Vegetal) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

MOOSIKAPALA, L.; TE-CHATO, S. Application of *in vitro* conservation in *Vetiveria zizanioides* Nash. **Journal of Agricultural Technology**, Bangkok, v. 6, n. 2, p. 401-407, 2010.

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

NEMETH, G. Induction of rooting. In: BAJAJ, Y. P. S. (ed.). **Biotechnology agriculture and forestry I**, Berlin: Springer-Verlag, 1986.

OLIVEIRA, R.P.; NINO, A.F.P.; NICKEL, O. Limpeza de patógenos e propagação in vitro de cultivares de pereira. Pelotas: EMBRAPA, 2004.

OREGO, K.O.; GITONGA, N.M. MWANGI, M. OMBORI, O. NGUGI, M. Cost-effective nutrient sources for tissue culture of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 66, p. 12964-12973. 2012.

ORLIKOWSKA, T., KUCHARSKA, D., HORBOWICZ, M. The reaction of raspberry and blackberry cultivars to drought stress simulated in vitro by polyethylene glycol (peg) 6000. **Acta Hort.** (ISHS) v.839, p. 337-342. 2009.

PAIVA-NETO, V.B.; OTONI, W.C. Carbon sources and their osmotic potential in plant tissue culture: does it matter?. **Science Horticulture**, v.97, p. 193-202. 2003.

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.

PASQUAL, M. **Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicações: meios de cultura**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 74 p

PASTORI, G.M.; FOYER, C. Common components, networks and pathways of cross-tolerance to stress. The central role of 'redox' and abscisic acid-mediated controls. **Plant Physiology** v.129, p.460-468, 2002.

PEREIRA, D.M et al. **Micropropagação de acessos de mandioca integrantes da coleção da fundação estadual de pesquisa agropecuária (FEPAGRO RS)**. 2007.

RADEMACHER, W. Growth retardants: effects on gibberellin biosynthesis and other metabolic pathways. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. v.51, p. 501-531, 2000.

RADMANN, E.B., FACHINELLO, J.C., PETERS, J.A. Efeito de auxinas e condições de cultivo no enraizamento in vitro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.24, n.3, p. 624-628, dez. 2002.

REDDY, A. R.; CHAITANYA, K. V.; VIVEKANANDAN, M. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. **Journal of Plant Physiology**, v. 161, p. 1189-1202, 2004.

REED, B. M.; SARASAN, V.; KANE, M.; BUNN, E.; PENCE, V. C. Biodiversity conservation and conservation biotechnology tools. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 47, p. 1-4, 2011.

ROLLAND, F.; MOORE, B.; SHEEN, J. Sugar sensing and signaling in plants. **The Plant Cell**, Rockville, v. 14, n.1, p. 185-205, 2002.

SÁ, A. J; LÉDO, A. da S.; LÉDO, C. A. da S. Conservação *in vitro* de mangabeira da região nordeste do Brasil. **Ciência Rural**, v. 41, n.1, p.57-62, 2011.

SARKAR, D.; NAIK, P. S. Factors affecting minimal growth conservation of potato microplants in vitro. **Euphytica, Dordrecht**, v. 102, n. 2, p. 275-280, 1998.

SCHUCH, M.W.; ERIG, A.C. Micropropagação de plantas frutíferas. In: FACHINELLO, J.C. et al. **Propagação de plantas frutíferas**. Brasília: DF: Embrapa Informação Tecnológica, p.155-173. 2005.

SHIBLI, R.D., SHATNAWI, M.A., SUBAIH, W.S., AJLOUNI, M.M. In vitro conservation and cryopreservation of plant genetic resources: a review. **World journal of agricultural sciences**, v. 2, p. 372-382.2006,

SHERWINSKI-PEREIRA J.E.; COSTA F.H.S.; CAMILLO J.; SILVA D.B.; ALVES R.B.N.; VIEIRA R.F. Tissue cultures storage of Brazilian medicinal plants germoplasm. **Acta horticulturae**, v. 860, p. 211-241, 2010.

SILVA, T.L.;SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E. In vitro conservation of *Piper aduncum* and *Piper hispidinervum* under slow-growth conditions. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 46, 384-389, 2011.

SILVA, N. D. G. **Radiação gama e conservação in vitro de amoreira-preta**. 2013. 52 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2013.

SILVA, N. D. G. da.; DUTRA, L. F.; BIANCHI, V. J.; SOMMEER, L. R.; VARGAS, D. P.; PETERS, J. A. Conservação *in vitro* de amoreira-preta: crescimento lento. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v. 12, n. 1, p. 7-12. 2016.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 954 p.

THORPE, T.; STASSOLA, C.; YENG, E. C.; DE KLERK, G-J.; ROBERTS, A.; GEORGE, E.F. 2008. The components of plant culture media II: organic additions, osmotic and pH effects, and support systems. In: GEORGE EF; HALL MA; KLERK GJ (eds). **Plant propagation by tissue culture**, vol. 1. New York: Springer. p. 115-173.

VANSTRAELEN, M., BENKOVA, E. Hormonal interactions in the regulation of plant development. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.** V. 28, p. 463-487, 2012.

VASCONCELOS, A.G.V.; TOMAS, L.F.; CAMARA, T.R.; WILLADINO, L. Hiperidricidade: uma desordem metabólica. **Ciência Rural**, v.42, n. 5, p. 837-844. 2012.

VIEIRA, L. J. **Conservação *in vitro* e criopreservação de espécies de Manihot**. 2013. 103 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) –Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2013.

VILLA, F.; ARAÚJO, A.G. de; PIO, L.A.S.; PASQUAL, M. Multiplicação *in vitro* da amoreira-preta 'Ébano' em diferentes concentrações de meio MS e BAP. **Ciência Agrotecnologia**, Lavras, v.29, n.3, p.582-589, 2005.

VILLA, F., PASQUAL, M., PIO, L. A. S., TEODORO, G. S., MIYATA, L. Y. Multiplicação *in vitro* de amoreira-preta 'Cherokee': Efeito de meios de cultura, cinetina e GA3. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 1, n. 1, p. 357-362 , 2006.

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.

WILLIAMSON, C. L.; SLOCUM, R. D. Molecular cloning and evidence for osmoregulation of the 1-pyrroline-5-carboxylate reductase (proC) gene in Pea (*Pisum sativum* L.). **Plant Physiology**, v. 100, p.1464-1470, 1992

WITHERS, L.A.; WILLIAMS, J.T. 1998. Conservação *in vitro* de recursos genéticos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Orgs.). *Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas*. Brasília: Embrapa – SPI / Embrapa – CNPH. p.297-330.