

**Composição da matriz de encapsulamento de gemas axilares de morangueiro
'San Andreas': in vitro e sobrevivência ex vitro**

**Composition of the 'San Andreas' axillary gemstone encapsulation matrix: in
vitro and ex vitro survival**

DOI:10.34117/bjdv6n12-614

Recebimento dos originais: 17/11/2020

Aceitação para publicação: 17/12/2020

Letícia Vanni Ferreira

Doutora em Agronomia, área de concentra Fruticultura de Clima Temperado, pela UFPEL

Endereço pessoal: Rua Giovanni Signor, 272. Fenavinho. Bento Gonçalves, RS

E-mail: letivf@hotmail.com

Daiane Peixoto Vargas

Doutora em ciencias/fisiologia vegetal

universidade federal de lavras

Endereço pessoal: Praça domingos Rodrigues número 10 CEP 96010-440. Pelotas/Rs.

E-mail: dvbio@hotmail.com

Rafaela Silva Formoso

mestre em fisiologia vegetal, universidade federal de pelotas, praça capitao nestor corbiniano de andrade 52 apto401, Pelotas, RS.

E-mail: rafaelasformoso@gmail.com

Marisa Taniguchi

Mestra em Fisiologia Vegetal.

Endereço: Rua Bento Martins, 1405. Pelotas/RS

E-mail: marisataniguchi@yahoo.com.br

Liana Viviam Ferreira

Doutora em Fisiologia Vegetal pela UFPel. Doutora em Fisiologia Vegetal pela UFPEL.

Endereço: Instituto Biotecnológico de Reprodução Vegetal do Centro Universitário da Região da campanha - INTEC/URCAMP. Rua Flores da Cunha, nº 310, Centro, Bagé-RS

Juliana Hey Coradin

Mestre em Engenharia Química

Instituição: Embrapa Clima Temperado

Endereço: BR 392, km 78 - Distrito de Monte Bonito - Pelotas - RS

E-mail: juliana.coradin@embrapa.br

Leonardo Ferreira Dutra

Formação acadêmica mais alta: Doutor

Instituição: Universidade Federal de Pelotas

Endereço: Rodovia BR-392, Km 78, 9º Distrito, Monte Bonito, Caixa Postal 403, CEP: 96010-971 - Pelotas, RS

E-mail: leonardo.dutra@embrapa.br

RESUMO

A tecnologia de encapsulamento de explantes cultivados in vitro compõe uma das principais ferramentas tecnológicas complementares a micropropagação, com aplicação tanto para conservação quanto para a propagação in vitro. Diante desta possibilidade o presente trabalho objetivou avaliar a composição da matriz de encapsulamento com fitorreguladores na regeneração de gemas axilares de morangueiro cv. San Andreas. Gemas axilares obtidas a partir de brotações in vitro foram encapsuladas em matriz de alginato de sódio 5,0% (p/v) constituído de meio MS suplementado com 3% de sacarose e combinações de Zeatina (ZEA) a 0 e 18 μM ou Benzilaminopurina (BAP) a 0 e 18 μM e Giberelina (GA3) a 0 e 1,44 μM . O tratamento controle constou de meio sem regulador de crescimento. Posteriormente as unidades encapsuláveis foram individualmente resgatadas e gotejadas em solução de Cloreto de Cálcio (0,1 M), na qual permaneceram por 20 minutos para complexação. As sementes sintéticas foram submetidas a três lavagens em água destilada e esterilizada, descomplexadas e inoculadas em meio de cultura (MS) mantidas por 30 dias a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ com fotoperíodo de 16 horas e radiação fotossintética ativa de $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. As variáveis regeneração, comprimento da parte aérea e de raiz foram avaliadas aos 30 dias de cultivo. Após avaliação, as mudas foram lavadas e transplantadas para bandejas de poliestireno e mantidas em casa de vegetação por 30 dias. Avaliou-se a sobrevivência do material vegetal. O uso do meio MS com ou sem regulador de crescimento na matriz de alginato não interferiu na regeneração e sobrevivência dos explantes de morangueiro 'San Andreas' nas condições experimentais testadas in vitro e ex vitro.

Palavras-chave: *Fragaria x ananassa* Duch., matriz de alginato, micropropagação, conservação in vitro.

ABSTRACT

The technology of encapsulation of explants cultivated in vitro is one of the main technological tools complementary to micropropagation, with application for both conservation and propagation in vitro. In view of this possibility, the present study aimed to evaluate the composition of the encapsulation matrix with phytohormones in the regeneration of axillary buds of strawberry cv. San Andreas. Axillary buds obtained from in vitro shoots were encapsulated in a 5.0% (w / v) sodium alginate matrix consisting of MS medium supplemented with 3% sucrose and combinations of Zeatin (ZEA) at 0 and 18 μM or Benzylaminopurine (BAP) at 0 and 18 μM and Gibberellin (GA3) at 0 and 1.44 μM . The control treatment consisted of medium without growth regulator. Subsequently, the encapsulating units were individually rescued and dripped in a solution of Calcium Chloride (0.1 M), in which they remained for 20 minutes for complexation. The synthetic seeds were subjected to three washes in distilled and sterilized water, uncomplexed and inoculated in culture medium (DM) maintained for 30 days at $25 \pm 2^\circ\text{C}$ with a 16-hour photoperiod and active photosynthetic radiation of $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. The variables regeneration, shoot length and root were evaluated at 30 days of cultivation. After evaluation, the seedlings were washed and transplanted to polystyrene trays and kept in a greenhouse for 30 days. The survival of plant material was evaluated. The use of MS medium with or without growth regulator in the alginate matrix did not interfere in the regeneration and survival of strawberry explants 'San Andreas' under experimental conditions tested in vitro and ex vitro.

Keywords: *Fragaria x ananassa* Duch., alginate matrix, micropropagation, conservation in vitro.

1 INTRODUÇÃO

O Brasil, segundo Reisser Junior et al. (2014), figura como um dos maiores produtores mundiais de morango, o que contribui significativamente para a economia do país. O cultivo de morangos tem esse destaque devido à sua grande aceitação para o consumo *in natura* ou na forma de produtos industrializados como doces, iogurtes, geleias e sorvetes (RICHTER et al., 2017) e também se insere no mercado mundial como importante alternativa de diversificação agrícola (LUNARDECZ, 2015). Devido à necessidade de alta qualidade de produto para a comercialização, exigência do mercado consumidor, é necessário que as mudas sejam de alto padrão e em quantidade suficiente para atender a demanda (DIAS et al., 2014). Na produção de mudas de morangueiro é recomendado que sejam adquiridas plantas matrizes oriundas da cultura de tecidos (ANTUNES e FILHO, 2005). Esta técnica permite a produção massal de mudas com alta qualidade genética e fitossanitária, atendendo às exigências e padrões necessários para a produção de matrizes de morangueiro (DIAS et al., 2014).

Entretanto, o cultivo contínuo dos tecidos de morangueiro *in vitro* causa perda de vigor dos explantes após a permanência por longos períodos, os quais não se apresentam mais responsivos após sucessivos subcultivos (PASA et al., 2012), podendo ainda causar variação somaclonal (FONSECA et al., 2013). Por este motivo, é recomendável realizar no máximo cinco repicagens do morangueiro durante a fase de multiplicação, para evitar a ocorrência de variação somaclonal, levando à obtenção de plantas distintas das originais (DUTRA et al., 2012).

Neste contexto, a tecnologia de produção de sementes sintéticas ou encapsulamento tem se mostrado como importante ferramenta na micropropagação e conservação *in vitro* de germoplasma. Além de permitir a manutenção da identidade genética do material vegetal e a rápida multiplicação dos propágulos, a técnica facilita a troca de germoplasma e a conservação de genótipos desejáveis a baixos custos sob condições *in vitro*, além de permitir o estabelecimento de propágulos diretamente no campo (MARUYAMA et al., 1997; NASSAR, 2003; RECH FILHO, 2004; PEREIRA et al., 2008).

Propágulos não embriogênicos se tornaram alternativas adequadas aos embriões somáticos para encapsulamento, viabilizando protocolos de unidades encapsuláveis para conservação e/ou preservação de explantes, utilizando desde microbrotos, gemas axilares até ápices caulinares de *Vitex trifolia* e *Withania coagulans* (AHMED et al., 2015; RATHORE; KHENI, 2017). Estudos que visem à conservação de germoplasma *in vitro*, aliada à redução do risco de variação somaclonal devido às constantes repicagens derivadas da manutenção, são cruciais, bem como avaliar a constituição da cápsula para produção de sementes sintéticas para cada genótipo separadamente (FARIA et al., 2014).

Tem sido relatada a utilização de osmorreguladores como sorbitol, manitol e fitorreguladores como BAP, ABA e AG₃ adicionados na matriz de alginato buscando melhorar a conversão das unidades encapsuladas em plantas (ARA et al., 1999; INOCENTE, 2002; NIEVES et al., 1998; SIQUEIRA, 2010).

Na cultura do morangueiro alguns trabalhos foram realizados acerca do uso de reguladores de crescimento no meio utilizado para encapsulamento de morangueiro (Rout et al., 2001; Lisek e Orlikowsk, 2004, Awatef e Badr-Elden, 2013), demonstrando que o comportamento entre cultivares de morangueiro encapsuladas pode variar, algumas respondem melhor quando adicionado BAP ao meio, enquanto outras não exigem regulador de crescimento.

Neste contexto, o trabalho teve como objetivo avaliar a composição da matriz de encapsulamento com fitorreguladores na regeneração de gemas axilares de morangueiro cv. San Andreas, visando analisar a aplicabilidade deste método alternativo para a micropropagação e conservação da espécie.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Gemas axilares foram obtidas a partir de brotações *in vitro* de morangueiro cultivar ‘San Andreas’, cultivadas previamente em meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) acrescido de BAP na concentração $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ e subcultivados por 15 dias em MS isento de regulador de crescimento. Das brotações desenvolvidas, gemas laterais foram excisadas e imersas em solução para formar cápsulas de alginato de sódio a 2,5% (p/v), contendo macro e micronutrientes, vitaminas do meio MS (exceto cloreto de cálcio), sacarose (30 g L^{-1}) e ZEA ou BAP isolados ($18 \mu\text{M}$) ou combinados com $1,44 \mu\text{M}$ de GA_3 . O tratamento controle constou de meio sem regulador de crescimento. Para complexação, as gemas isoladas foram resgatadas individualmente e gotejadas em solução com cloreto de cálcio (100 mM) na qual permaneceram por 20 min.

As cápsulas formadas foram submetidas à dupla lavagem em água deionizada esterilizada e imersas em solução de nitrato de potássio KNO_3 (100 mM) por 15 min para descomplexação, seguido de nova lavagem. Posteriormente, foram inoculadas em meio de cultura MS e mantidas em sala de crescimento sob irradiância de $43 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 h e temperatura de $25 \pm 2^\circ \text{C}$ por 15 dias. A metodologia de encapsulamento executada foi adaptada a partir da técnica definida por Murashige (1978).

As variáveis avaliadas foram senescência, regeneração e comprimento da parte aérea e de raiz, obtidas aos 30 dias de cultivo *in vitro*. Foram consideradas regeneradas as sementes sintéticas que apresentaram as cápsulas rompidas, a partir do desenvolvimento das gemas axilares. Após estas avaliações, as mudas foram lavadas em água corrente para retirada do excesso de meio de cultura e transplantadas para bandejas de poliestireno com 72 células contendo substrato comercial, mantidas em casa de vegetação por 30 dias, quando se avaliou a sobrevivência do material vegetal.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com cinco repetições contendo cinco explantes por tratamento. Os resultados foram submetidos à análise de variância e,

quando o efeito foi significativo, realizou-se o teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. Dados expressos em percentagem (x) foram transformados para raiz quadrada do arco seno ($x/100$) 0,5. As análises estatísticas foram realizadas com o programa SISVAR versão 5.1 (FERREIRA, 2014).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os fatores em estudo não influenciaram nas variáveis analisadas (Tabela 1). Em todas as cápsulas inoculadas em vitro verificou-se a emissão de brotações. Ao final de 30 dias de cultivo ex vitro foram observados percentuais de sobrevivência de até 96%.

Tabela 1. Emissão de brotos (EB), comprimento de brotos, comprimento de raiz, senescência (SN) e sobrevivência (SB) de morangueiro 'San Andreas' após 30 dias de encapsulamento (cultivo in vitro) e sobrevivência após 30 dias no substrato em casa de vegetação (cultivo ex vitro). Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, 2020.

Tratamentos	EB (%)	Comprimento (cm)		SN (%)	SB (%)
		Brotos	Raiz		
MS (controle)	100 ns	3,27 ns	3,62 ns	25,3ns	96,27ns
18µM ZEA	100	3,58	4,72	18,0	93,27
18µM BAP	100	2,59	3,29	30,0	89,99
18µM ZEA + 1,44 µM GA ₃	100	3,51	3,86	24,0	86,53
18µM BAP + 1,44 µM GA ₃	100	3,43	3,16	24,0	79,97
C.V. (%)	0	62,15	61,97	112,09	14,59

*Médias das colunas não diferiram estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey a 5%.

A conversão dos brotos encapsulados em plântulas é o aspecto mais importante da tecnologia de semente sintética (STANDARDI e PICCIONI, 1998). No presente estudo, a formação de plântulas foi alcançada independente do tratamento.

Sugere-se que a utilização da matriz de encapsulamento contendo somente o meio de cultivo MS é suficiente para induzir boa taxa de rebrota das gemas axilares de morangueiro. Estes dados estão de acordo com Lisek e Orlikowsk (2004), os quais também não observaram a necessidade de reguladores de crescimento no meio utilizado para encapsulamento de morangueiro.

Entretanto, Rout et al. (2001) relataram que cápsulas de alginato preparadas com meio MS sem regulador de crescimento apresentaram baixa porcentagem de brotação e crescimento mais lento do que as sementes sintéticas contendo meio MS com reguladores de crescimento. Do mesmo modo, Awatef e Badr-Elden (2013), ao testarem diferentes concentrações de BAP adicionadas ao meio MS + alginato na matriz de encapsulamento, obtiveram como melhor resultado a utilização de 2 mg L⁻¹ de BAP na rebrota de morangueiro cultivar Camarosa após seis semanas de cultivo in vitro. Estes dados demonstram que o comportamento entre cultivares de morangueiro encapsuladas pode variar, algumas

respondem melhor quando adicionado BAP ao meio, enquanto outras não exigem regulador de crescimento.

Cada espécie apresenta suas exigências nutricionais específicas que podem ou não ser atendidas pela composição do meio MS, com macro e micronutrientes, além de vitaminas (DEZAN et al., 2012).

Para os explantes da cultivar San Andreas, apenas o meio MS para constituição da cápsula foi o suficiente para a proteção e a disponibilização de nutrientes. Essa disponibilização de nutrientes pela cápsula facilita o crescimento e sobrevivência do explante e possibilita sua germinação (SINGH et al., 2010).

Para o uso das unidades encapsuláveis, um dos fatores considerados limitantes é a conversão delas em plantas (ADRIANI et al., 2000). Neste trabalho, foi possível estabelecer a composição de cápsulas de alginato para a cultivar de morangueiro ‘San Andreas’ e ainda alcançar resultados satisfatórios após a aclimatização, obtendo-se plantas completas. Assim, o uso da técnica de encapsulamento de estruturas vegetativas, pode contribuir para manutenção e troca de recursos vegetais de morangueiro.

A matriz de encapsulamento serve como reservatório de nutrientes e atua como endosperma natural para o desenvolvimento dos brotos (PICCIONI, 1998). É formada pela combinação de alginato de sódio e cloreto de cálcio. As concentrações de alginato de sódio de 2,5% a 4% e cloreto de cálcio 0,1 M, utilizadas neste estudo, foram consideradas adequadas para a formação de esferas, permitindo cápsulas firmes, de tamanho ideal e uniformemente esféricas (KUMAR et al. 2010; SUNDARARAJ et al. 2010; SHARMA e SHAHZAD 2012), reduzindo assim os efeitos do estresse salino resultante da exposição dos segmentos nodais à solução de alginato de sódio (SINGH et al. 2009).

4 CONCLUSÃO

O uso do meio MS na matriz de alginato de sódio é suficiente para induzir a rebrota de gemas encapsuladas in vitro e para a sobrevivência dos explantes de morangueiro da cultivar ‘San Andreas’ em ambiente ex vitro, não havendo necessidade de adicionar regulador de crescimento.

REFERÊNCIAS

- ADRIANI, M.; PICCIONI, E.; STANDARD, A. Effect of different treatments on the conversion of 'Hayward' kiwi fruit synthetic seeds to whole plants following encapsulation of in vitro-derived buds. **Journal of Crop and Horticultural Science**, v. 28, n.1, p. 59-67, 2000.
- AHMED, M. D. R.; ANIS, M.; AL-ETTA, H. A. Encapsulation technology for short-term storage and germplasm exchange of *Vitex trifolia* L. **RendicontiLincei**, v.26, n.2, p. 133–139, 2015.
- ARA, A.; JAISWAL, U.; JAISWAL, V. S. Germination and plantlet regeneration from encapsulated somatic embryos of mango (*Mangifera indica* L.). **Plant Cell Reports**, v.19, p.166-170, 1999.
- AWATEF.; BADR-ELDEN. An effective protocol for in vitro storage and ex vitro re-growth of strawberry capsules. **Atlas Journal of Chemistry & Biochemistry**, v. 1, n.2, p. 30-38, 2013.
- ANTUNES, L. E. C.; DUARTE FILHO, J. Importância. In: PEREIRA, D. P.; BANDEIRA, D. L.; QUINCOZES, E. da R. F. (Ed.). **Sistemas de produção do morango**. Pelotas: EMBRAPA Clima Temperado, (Sistema de produção, 5), 2005.
- DEZAN, L. F.; CANASSA, F.; SOUZA-LEAL, T.; DIOGO, J. A.; MASSARO, R.; CORDEIRO, G. M.; MORAES, C.P. Crescimento in vitro de *Schomburgkia gloriosa* Lindl. em meio de cultivo simplificados. **Idesia**, v.30, n.2 p. 53-58, 2012.
- DIAS, M. S. C.; PÁDUA, J. G.; SILVA, A. F.; LONDE, L. N.; REIS, J. B. R. S.; JESUS, A. M. Cultivares. **Informe Agropecuário**, v. 35, n. 279, p. 39-47, 2014.
- DUTRA, L.F.; SILVA, N.D.G; DONINI, L.P.; NINO, A.F.P.; SILVA, F.O.X.; VIEIRA, F.C.B. Protocolos de micropropagação de plantas IV: morangueiro. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2012. 20 p. (Embrapa Clima Temperado. **Documentos**, 345).
- FARIA, R.A.N; COSTA, A.M.; LONDE, L.N.; SILVA, J.F.; RIBEIRO, E. B.; Influence of the composition of encapsulation matrix of microshoots of banana (*Musa* sp.) cv. Prata-anã Gorutuba Clone. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. 2, p. 472-478, 2014.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a guide for its bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e Tecnologia**, v.38, n.2, p.109-112, 2014.
- FONSECA, A. P.; SILVA, E. C.; PEREIRA, M. B.; OLIVEIRA, R. P. de; DORNELLES, A. L. C. Estabilidade fenotípica de genótipos de morangueiro submetidos a número variável de subcultivos *in vitro*. **Ciência Rural**, v. 43, n. 8, p.1345-1350, 2013.
- INOCENTE, G.C.C. Embriogênese somática e sementes sintéticas em *Feijoa sellowiana* Berg.: Sistema referência e aspectos morfo-histológicos e bioquímicos. 95 p. **Dissertação** (mestrado) Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.
- LISEK, A; ORLIKOWSKA, T. Factors influencing long-term storage of strawberry shoots in vitro. **Acta Horticulturae**, v. 560, n.34, p. 189-192, 2001.
- LUNARDECZ, A. **Produtores são capacitados pela Emater para produção de morangos sem uso do solo**. 2015.

KUMAR, S.; RAI, M.K.; SINGH, N.; MANGAL, M. Alginate-encapsulation of shoot tips of jojoba [*Simmondsia chinensis* (Link) Schneider] for germplasm exchange and distribution. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v.16, n.4, p.376–382, 2010.

MARUYAMA, E.; KINOSHITA, I.; ISHII, K.; OHBA, K.; SAITO, A. Germplasm conservation of the tropical forest trees, *Cedrela odorata* L., *Guazuma crinita* Mart., and *Jacaranda mimosaeifolia* D. Don., by shoot tip encapsulation in calcium-alginate and storage at 12-25 °C. **Plant Cell Reports**, v. 16, n.1, p. 393-396, 1997.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-97, 1962.

NASSAR, A. H. Slow growth storage of encapsulated germplasm of *Coffea arabica* L. **International Journal of Agriculture & Biology**, v. 5, p. 517-520, 2003.

NIEVES, N.; LORENZO, J. C.; BLANCO, M. A.; GONZÁLEZ, J.; PERALTA, H.; HERNÁNDEZ, M.; SANTOS, R.; CONCEPCIÓN, O.; BORROTO, C. G.; BORROTO, E.; TAPIA, R.; MARTINEZ, M. E.; FUNDORA, Z.; GONZÁLEZ, A. Artificial endosperm of *Cleopatra tangerine* zygotic embryos: a model for somatic embryo encapsulation. **Plant Cell, Culture & Micropropagation**, v. 54, n.2, p. 77-83, 1998.

OLIVEIRA, R. P. de; SCIVITTARO, W. B.; FINKENAUER, D. Produção de morangueiro da Cv. Camino Real em sistema de túnel. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.30, n.3, p.681-684, 2008.

PASA, M. S.; CARVALHO, G. L.; SCHUCH, M. W.; SCHIMITZ, J. D.; TORCHELSEN, M. de M.; NICKEL, G. K.; SOMMER, L. R.; LIMA, T. S.; CAMARGO, S. S. 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, J. E. S.; GUEDES, R. S.; COSTA, F. H. S.; SCHMITZ, G. C. B. Composição da matriz de encapsulamento na formação e conversão de sementes sintéticas de pimenta-longa. **Horticultura Brasileira**, v. 26, n. 1, p. 93-96, 2008.

RATHORE, M.S.; KHENI, J. Alginate encapsulation and seedling regeneration in vitro in critically endangered medicinal plants *Withania coagulans* (Stocks) Dunal. Anais da Academia Nacional de Ciências da Índia, Seção B - **Ciências Biológicas**, v.87, n.1, p. 129–134, 2017.

RECH FILHO, A. **Biorreatores de imersão temporária e unidades encapsuláveis como ferramentas na consolidação de protocolos de micropropagação de bromélias**. Dissertação (mestrado), Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). 74 p. Florianópolis, 2004.

REISSER JUNIOR, C.; ANTUNES, L.E.C.; ALDRIGHI, M.; VIGNOLO, G.; Panorama do cultivo de morangos no Brasil. **Campo e negócios**, 2015.

RICHTER, A.; FAGUERAZZI, D.S.Z.; da SILVA, P.S.; ARRUDA, A,L.; TILWITZ. Produção de morangueiro em diferentes sistemas de cultivo. Revista da 14ª Jornada de Pós-Graduação e Pesquisa. **Revista da Jornada da Pós-Graduação e Pesquisa Congrega**. Urcamp Bagé - RS, vol. 14, n.14, 2017.

ROUT, G. R.; DAS, G.; SAMANTARAY, S.; DAS, P. Micropropagation of *Plumbago zeylanica* L. by encapsulated nodal explants. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, v.76, n.1, p. 24-29, 2001.

SINGH, S.K.; RAI, M.K.; ASTHANA, P.; PANDEY, S.; JAISWAL, V.S.; JAISWAL, U. Plant regeneration from alginate-encapsulated shoot tips of *Spilanthes acmella* (L.) Murr., a medicinally important and herbal pesticidal plant species. **Acta Physiologiae Plant**, v. 31, n.3, p.649–653, 2009.

SINGH, S. K.; RAI, M. K.; ASTHANA, P.; SAHOO, L. Alginate-encapsulation of nodal segments for propagation short-term conservation and germplasm exchange and distribution of *Eclipta alba* (L.). **Acta Physiologiae Plantarum**, v.32, p.607-610, 2010.

SIQUEIRA, A. B. **Ocorrência de populações naturais de *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke e *Piper peltatum* L. ao longo dos rios Solimões e Amazonas e estratégias de conservação ex situ de germoplasma por técnicas in vitro, temperaturas sub zero e criogênicas.** 2010. 123 p. Tese (Doutorado em Biotecnologia), Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2010.

SUNDARARAJ, S.C.; AGRAWAL, A.; TYAGI, R.K. Encapsulation for in vitro short-term storage and exchange of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) germplasm. **Scientia Horticulturae**, v.125, n.4, p.761-766, 2010.

SHARMA, S.; SHAHZAD, A. Encapsulation technology for short-term storage and conservation of a woody climber, *Decalepisha miltonii* Wight and Arn. **Plant Cell Tissue Organ Cult**, v. 111, n.2, p.191-198, 2012.

STANDARDI, A., PICCIONI, E. Recent perspectives on synthetic seed technology using non embryogenic in vitro-derived explants. **International Journal Plant Sciences**, v. 159, n.6, p. 968–978, 1998.