

# TIPO DE EXPLANTE E CONSTITUIÇÃO DA CÁPSULA NA PRODUÇÃO E ARMAZENAMENTO DE UNIDADES ENCAPSULÁVEIS DE GABIROBEIRA (*Campomanesia pubescens*)

## EXPLANT TYPE AND CONSTITUTION OF THE CAPSULES FOR GABIROBEIRA (*Campomanesia pubescens*) SYNTHETIC SEED PRODUCTION AND STORAGE

NÁDIA ALVES CAMPOS<sup>1</sup>, RENATO PAIVA<sup>2</sup>,  
MARIANA ALINE SILVA ARTUR<sup>3</sup>, LUCIANO COUTINHO SILVA<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Dra – Departamento de Biologia/DBI – Universidade Federal de Lavras/UFLA – 37200-000 – Lavras, MG – nadialvensep@hotmail.com

<sup>2</sup>PhD – Departamento de Biologia/DBI – Universidade Federal de Lavras/UFLA – 37200-000 – Lavras, MG – renpaiva@dbi.ufla.br

<sup>3</sup>Bióloga – Departamento de Biologia/DBI – Universidade Federal de Lavras/UFLA – 37200-000 – Lavras, MG – marianasartur@yahoo.com.br

<sup>4</sup>Dr – Departamento de Biologia Molecular e Celular – Universidade Federal da Paraíba/UFPB – 58051-900 – João Pessoa, PB – lucoutsilva@yahoo.com.br

### RESUMO

O encapsulamento por alginato de sódio é uma técnica simples, barata e eficiente de preservação de germoplasma, sendo especialmente empregada em espécies que produzem sementes não viáveis ou com dificuldade de propagação ou conservação. Várias espécies vegetais de importância econômica são encontradas no Cerrado, como por exemplo a gabirobeira (*Campomanesia pubescens*), que além de frutífera apresenta também importantes propriedades medicinais. Porém a espécie possui sementes recalcitrantes inviabilizando o armazenamento e conservação por métodos convencionais. Os objetivos deste trabalho foram de estabelecer um protocolo para produção de unidades encapsuláveis de gabirobeira, testando diferentes explantes e constituições para a matriz de alginato e avaliar o efeito de diferentes períodos de armazenamento (1, 7, 15 e 30 dias) dessas cápsulas a 4 °C. Foram testados dois meios para constituição da cápsula (MS ou água destilada) e dois tipos de explante (ápices caulinares e gemas axilares). A constituição do meio apresentou influência apenas para o tipo de explante gemas axilares. A taxa de rompimento das cápsulas contendo ápices caulinares foi de 100% enquanto que cápsulas contendo gemas axilares apresentaram rompimento inferior a 8%. O armazenamento de ápices caulinares a 4 °C foi possível por apenas sete dias sem o comprometer da taxa de rompimento das cápsulas.

**Termos para indexação:** Sementes recalcitrantes, *Myrtaceae*, cerrado, conservação *in vitro*.

### ABSTRACT

The sodium alginate encapsulation is a simple, cheap and efficient technique for germplasm preservation and is employed especially in species that produce non-viable seeds or present difficulties of propagation and conservation. Many plant species of economic importance are found in the Cerrado, such as gabirobeira (*Campomanesia pubescens*), which in addition of being a fruit plant, it also presents important medicinal properties. Since this specie presents recalcitrant

seeds, its storage and conservation by conventional methods is difficult. The objectives of this study were to establish a protocol for producing encapsulated units of gabirobeira, testing different explants and constitutions for the alginate matrix, as well as to evaluate the effect of different storage periods (1, 7, 15 and 30 days) of these capsules at 4 °C. Two capsules constitution (MS culture media or distilled water) and two types of explants (apical and axillary buds) were tested. Differences regarding the medium constitution were only observed when the axillary buds were used as explant. The rate of rupture of the capsules containing shoot tips was 100% while capsules containing axillary buds was only 8%. The storage shoot apices at 4 °C was possible only for seven days without compromising the rate of rupture of the capsules.

**Index terms:** Recalcitrant seeds, Myrtaceae, cerrado, *in vitro* conservation.

### INTRODUÇÃO

A técnica de encapsulamento de diferentes tipos de explantes, como embriões somáticos, ápices caulinares e gemas laterais em uma matriz de alginato é uma alternativa simples, barata e eficiente de preservação de germoplasma (HUNG; TRUEMAN, 2012; MISHRA et al., 2011), sendo especialmente empregada em espécies que produzem sementes não viáveis ou que apresentem alguma dificuldade de propagação e conservação, como no caso das sementes recalcitrantes (DAUD et al., 2008). Além da conservação genética, a produção de unidades encapsuláveis permite a troca de germoplasmas de forma segura e eficiente (GERMANA et al., 2011; HUNG; TRUEMAN, 2012).

(Recebido em 12 de dezembro de 2013 e aprovado em 14 de abril de 2014)

As unidades encapsuláveis são, na grande maioria dos trabalhos, compostas por alginato de sódio, pois esse componente apresenta diversas facilidades de aplicação, como a boa solubilidade em temperatura ambiente, boa propriedade geleificante, baixo custo, fácil manipulação e além de não apresentar efeito tóxico nem para as plantas nem para o homem (PEREIRA et al., 2008). Porém, apesar de já terem sido obtidos diversos resultados promissores da aplicação dessa técnica (BUSTAN et al., 2013; RIHAN et al., 2012; HUNG; TRUEMAN, 2012) o tipo de explante e os constituintes das cápsulas ainda carecem de investigação (GUEDES et al., 2007, PEREIRA et al., 2008) pois, as necessidades de nutrientes, compostos orgânicos e inorgânicos são espécie-específico requerendo estudos direcionados para a espécie de interesse (SUNDARARAJ et al., 2010; SHARMA et al., 2013). Com relação a espécies nativas do Cerrado brasileiro, os estudos sobre a produção e o armazenamento de unidades encapsuláveis ainda são bastante incipientes.

O Cerrado é o segundo maior bioma brasileiro, atrás apenas da Amazônia, ocupando cerca de um quarto de todo território (KLINK; MACHADO, 2005). Possui grande diversidade de flora e com um elevado grau de endemismo. Apesar da importância do Cerrado para a manutenção da biodiversidade vegetal, calcula-se que aproximadamente 55% da área original já sofreu com o desmatamento predatório (SANTOS, 2001; MACHADO, 2004), havendo risco do seu completo desaparecimento até 2030 (MACHADO et al., 2012).

Dentre as diversas espécies presentes no Cerrado que possuem potencial comercial para a exploração de frutos, além de propriedades medicinais, pode-se citar a gabirobeira (*Campomanesia pubescens*), que é uma espécie arbustiva da família Myrtaceae, que pode ser encontrada desde o estado de Minas Gerais até o Rio Grande do Sul (ALICE et al., 1995; CRAVO, 1994). Seus frutos são utilizados como alimentos por diversas espécies de pássaros e mamíferos e também na alimentação humana, além de ser indicada para plantios em áreas degradadas e como espécie ornamental.

As propriedades medicinais do chá das folhas e cascas de caule de gabirobeira são utilizadas popularmente no combate a afecções do aparelho urinário e contra diarreia devido a ação adstringente (FERREIRA, 1972; RODRIGUES; CARVALHO, 2001). Na região sul do Brasil, o chá das folhas da gabirobeira é utilizado para reduzir a obesidade (DICKEL, 2007), baseados em estudos que mostraram que o uso contínuo do chá contribuiu para redução da massa corporal (BIAVATTI et al., 2004). Recentemente tem sido estudada a ação do extrato das folhas da gabirobeira no controle da diabetes e como antibiótico (CARDOSO et al., 2010; VINAGRE et al., 2010). Pavan et al. (2009), também demonstraram que o acetato de etila, extraídos do frutos da gabirobeira, apresenta atividade contra o patógeno causador da tuberculose (*Mycobacterium tuberculosis*). Há pesquisas também mostrando a redução do nível de colesterol do sangue em pacientes afetados pela doença (KLAFKE et al., 2010). Apesar de seu potencial para a exploração econômica, das propriedades medicinais comprovadas e do fato de que a espécie produz sementes recalcitrantes e que perdem a viabilidade rapidamente, logo, impedindo o armazenamento e consequente conservação pelos métodos convencionais (DOSSEAU et al., 2011), a conservação do germoplasma de gabirobeira não tem recebido a devida atenção.

Diante da importância de conservação da biodiversidade vegetal do Cerrado, e nesse caso especificamente da gabirobeira (*Campomanesia pubescens*), o objetivo deste trabalho foi estabelecer um protocolo para a produção e armazenamento de unidades encapsuláveis de gabirobeira.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Material vegetal

Sementes de gabirobeira (*Campomanesia pubescens*) coletadas de populações nativas foram germinadas *in vitro* e utilizadas para a multiplicação de plantas em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado com 2,2 µM de BAP (6-benzilaminopurina),

3% (p/v) de sacarose e 0,7% (p/v) de ágar com pH ajustado em 5,8. As plantas foram mantidas em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas e temperatura de  $25 \pm 2$  °C e utilizados como fonte de para explantes. Em câmara de fluxo laminar, ápices caulinares e gemas laterais com aproximadamente 1 cm foram excisados com o auxílio de pinças e bisturis em um microscópio estereoscópico e utilizados como explantes para o encapsulamento.

### **Produção de unidades encapsuláveis**

Foram testados, como meio para diluição da matriz de alginato de sódio (2,5%), água destilada e meio de cultura MS sem adição de cálcio. Os explantes excisados (segmentos contendo ápices ou gemas laterais) foram então misturados às diferentes matrizes de alginato de sódio e, com o auxílio de pipetas automáticas, cada explante foi resgatado numa alíquota de 500 µL e gotejado um a um em solução com cloreto de cálcio (100 mM) para complexação da cápsula durante 20 minutos. Após período de complexação, as cápsulas formadas foram então mergulhadas em água estéril para remoção do excesso de cloreto de cálcio e, em seguida, mergulhadas em solução de nitrato de potássio (100 mM) para descomplexação durante 15 minutos. Após esse processo as unidades encapsuláveis foram inoculadas uma a uma em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio para germinação constituído de MS suplementado com 3% (p/v) de sacarose, 0,7% (p/v) de ágar e 2,2 µM de BAP e pH de 5,8. Os tubos de ensaio foram mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 h e temperatura de  $25 \pm 2$  °C por 30 dias. A taxa de germinação (rompimento da cápsula) foi avaliada aos 15 e 30 dias após a inoculação. Cada tratamento (solução de diluição da matriz de alginato de sódio x tipo de explante) continha 12 repetições, sendo cada tubo contendo uma cápsula considerada como uma repetição.

O delineamento experimental utilizado foi o DIC (Delineamento Inteiramente Casualizado) em esquema fatorial (2 x 2) e as médias de ruptura da cápsula foram avaliadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade no software Sisvar (FERREIRA, 2011).

### **Armazenamento à baixa temperatura**

Para testar o armazenamento das unidades encapsuláveis de *Campomanesia pubescens* a 4 °C, as cápsulas foram produzidas utilizando o mesmo protocolo citado anteriormente, porém utilizando apenas meio de cultura MS sem adição de cálcio para diluição da matriz de alginato de sódio e ápices caulinares como explantes. Cada explante foi resgatado em 500 µL da matriz de alginato e complexado durante 20 minutos em cloreto de cálcio (100 mM). Imediatamente após a complexação, as cápsulas foram lavadas em água estéril para remoção do excesso de cloreto de cálcio e acondicionadas em placas de Petri previamente esterilizadas. As placas contendo as cápsulas foram então armazenadas e mantidas em refrigerador na temperatura de 4 °C por diferentes períodos (1, 7, 15 e 30 dias).

Para o tratamento controle, as cápsulas não armazenadas a 4 °C passaram por todo o processo, incluindo a descomplexação, foram inoculadas uma a uma em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio MS suplementado com 2,2 µM de BAP, 3% (p/v) de sacarose e 0,7% (p/v) de ágar e mantidas em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas e temperatura de  $25 \pm 2$  °C.

Após cada período de armazenamento, as cápsulas foram retiradas do refrigerador e submetidas ao processo de descomplexação. Em seguida, foram inoculadas no mesmo meio do tratamento controle e mantidas sob as mesmas condições de cultivo. Após 30 dias da inoculação foi avaliada a taxa de germinação (rompimento da cápsula). Cada tratamento foi composto por 12 repetições onde cada tubo contendo uma cápsula foi considerado como uma repetição.

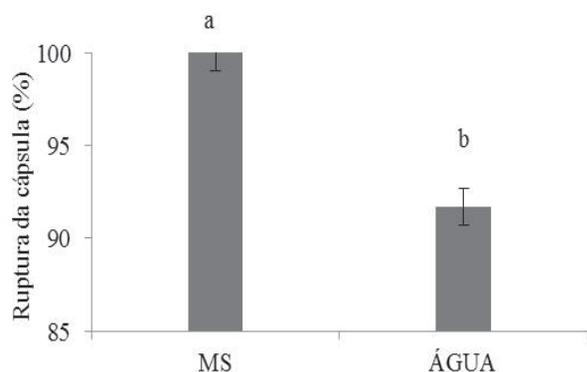
Para estudar o armazenamento das unidades encapsuláveis o delineamento experimental foi o DIC e as médias de ruptura da cápsula foram analisadas também pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (FERREIRA, 2011).

## **RESULTADOS E DISCUSSÕES**

### **Unidades encapsuláveis**

A utilização de ápices caulinares como explantes para a produção das unidades encapsuláveis, independente

dos meios utilizados para diluição da matriz de alginato de sódio (água destilada ou meio MS), permitiu uma taxa de rompimento de 100% das cápsulas contendo o meio MS e 91,7% das cápsulas contendo água como meio de diluição, sendo essa diferença significativa estatisticamente após 15 dias do encapsulamento em meio de germinação (Figura 1). Em contraste, os tratamentos que utilizaram gemas laterais como explantes não apresentaram o rompimento da cápsula após 15 dias do encapsulamento.

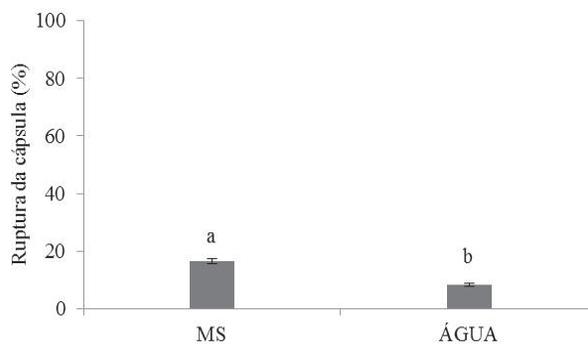


**FIGURA 1** – Taxa de ruptura de cápsulas de alginato de sódio compostas de meio MS ou apenas água contendo como explantes ápices caulinares, de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Após 30 dias do encapsulamento das gemas laterais, a taxa de germinação das cápsulas contendo água destilada ou meio MS foi de 8,4% e 16,7%, respectivamente, sendo essa diferença estatisticamente significativa (Figura 2). Quando foram utilizadas gemas apicais como explantes, a taxa de germinação permaneceu a mesma após 30 dias do encapsulamento, porém as plântulas já se mostravam em desenvolvimento avançado, apresentando primórdios foliares (dados não mostrados).

Os primeiros estudos com unidades encapsuláveis utilizaram embriões somáticos como fonte de explantes, porém a dificuldade de obtenção desse tipo de material em algumas espécies levou ao uso de outros explantes, como gemas laterais e apicais (PATTNAIK et al., 2000). Atualmente esses são os tipos de explantes mais utilizados para a produção

de unidades encapsuláveis devido à facilidade de obtenção e do menor risco de variação somaclonal, muito comum em culturas embriogênicas (STANDARDI; PICCIONI, 1998; ARA et al., 2000; SHARMA et al., 2013). É comum ápices caulinares apresentarem melhores resultados, já que normalmente gemas axilares possuem certo grau natural de dormência (SHARMA et al., 2013).

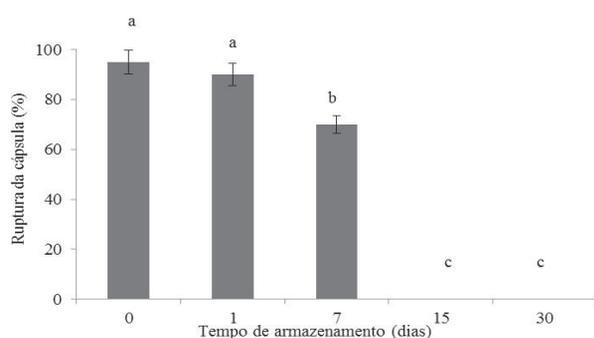


**FIGURA 2** – Taxa de ruptura de cápsulas de alginato de sódio constituídas de água destilada ou meio MS e contendo gemas axilares de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A qualidade das cápsulas e o desenvolvimento dos explantes dependem, primeiramente, da constituição da própria cápsula que por sua vez está relacionada com a quantidade e disponibilidade de nutrientes, do tipo de explante utilizado e, eventualmente, da quantidade e tipo de reguladores de crescimento adicionados (SENARATNA, 1992; SHARMA, et al., 2013). Para a maioria das espécies já estudadas, a adição de nutrientes presentes no meio MS é altamente recomendada, porém, algumas espécies de *Meliaceae* mostraram melhor taxa de ruptura da cápsulas quando essas foram produzidas sem a adição de açúcar ou nutrientes (SHARMA et al., 2013).

#### Encapsulamento e armazenamento

O tratamento controle (cápsulas não armazenadas a 4 °C) e as cápsulas armazenadas por apenas um dias não diferiram entre si estatisticamente, apresentando taxas de ruptura de 95 e 90% respectivamente. Após 7 dias em refrigerador essa taxa caiu para 70%, chegando a 0 após 15 dias (Figura 3).



**FIGURA 3** – Taxa de ruptura da cápsula após armazenamento a 4 °C segundo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

As condições mais utilizadas e que apresentam melhores resultados para a conservação de plantas *in vitro* a médio prazo (por até 10 meses), são baixa luminosidade e baixas temperaturas, porém, algumas particularidades podem explicar a baixa eficiência no armazenamento de unidades encapsuláveis. O alginato de sódio ao ser polimerizado com o cloreto de cálcio, embora exerça uma proteção sobre o explante, pode sofrer uma forte e rápida desidratação ao entrar em contato com o ar, tornando a cápsula endurecida e dificultando, ou mesmo impedindo, o desenvolvimento dos explantes e conseqüentemente o rompimento da cápsula (LAMBARDI, 2006). Além disso, a desidratação da cápsula limita a respiração do material vegetal levando a uma rápida perda da viabilidade (REDENBAUGH, 1993). Todas essas dificuldades tendem a aumentar com o tempo de armazenamento (LAMBARDI, 2006) como foi visto nos resultados obtidos no presente trabalho.

Outro fator importante que pode influenciar o armazenamento é a temperatura que, necessariamente deve ser baixa, pode variar para cada espécie (AHMAD; ANIS, 2010; TABASSUM, 2010). Para algumas culturas tropicais e sub-tropicais, altas temperaturas chegando algumas vezes a 25 °C, podem ser mais eficientes que baixas temperaturas para o armazenamento e desenvolvimento dos explantes, entretanto, o período de armazenamento é drasticamente reduzido (SUNDARARAJ, 2010). O armazenamento de unidades encapsuláveis de espécies da família *Meliaceae*

e *Myrtaceae* foi mais eficiente na faixa de temperatura de 10 a 14 °C do que a 4 °C, entretanto, as cápsulas foram armazenadas em placas contendo meio de cultura (HUNG; TRUEMAN, 2012), diferentemente do que foi feito neste presente trabalho.

Apesar do curto período de armazenamento das cápsulas obtido neste trabalho (sete dias), o armazenamento diretamente em placa de Petri sem adição de nenhum meio de cultura ou agente osmótico facilita o transporte e troca de material genético entre diferentes instituições de pesquisas.

### CONCLUSÕES

É possível a produção de unidades encapsuláveis de gabiroleira utilizando água ou MS na constituição da cápsula e ápices caulinares como explantes.

O armazenamento das unidades encapsuláveis é possível por sete dias em refrigerador a 4 °C.

### AGRADECIMENTOS

CNPq, CAPES e FAPEMIG.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMAD, N.; ANIS, M. Direct plant regeneration from encapsulated nodal segments of *Vitex negundo*. **Biologia Plantarum**, Prague, v. 54, n. 4, p. 748-752, dez. 2010.
- ALICE, C. B. et al. Plantas medicinais de uso popular: **Atlas Farmacognóstico**. Canoas: ULBRA, 205p. 1995.
- ARA, H.; JAISWAL, U.; JAISWAL, V.S. Synthetic seed: prospects and limitations. **Current Science**, Bangalore, v. 78, n. 12, p. 1438-1444, 2000.
- BIAVATTI, M. W.; FARIAS, S. N.; PRADO, S. R. T. Preliminary studies on *Campomanesia xanthocarpa* (Berg.) and *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) J. F. Macbr. aqueous extract: weight control and biochemical parameters. **Journal of Ethnopharmacology**, Leiden, v.93, n.3, p.385-389, 2004.
- BUSTAM, S. et al. Selection of optimal stage for protocorm-like bodies and production of artificial seeds for direct regeneration on different media and short term storage of *Dendrobium Shavin White*. **Plant Growth Regulation**, n. 69, p. 215-224, 2013.

- CARDOSO, C. A. L. et al. Antimicrobial activity of the extracts and fractions of hexanic fruits of *Campomanesia* species (Myrtaceae). **Journal of Medicinal Food**, New Rochele, v. 13, n. 5, p. 1273-1276, oct. 2010.
- DAUD, N.; TAHA, R.M.; HASBULLAH, N.A. Artificial seed production from encapsulated micro shoots of *Saintpaulia ionantha* Wendl. (African Violet). **Journal of Applied Sciences**, New York, v. 8, n. 24, p. 4662-4667, dec. 2008.
- DICKEL, M. L.; RATES, S. M. K.; RITTER, M. R. Plants popularly used for losing weight purposes in Porto Alegre, South Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, Leiden, v. 109, n. 1 p. 60-71, jan. 2007.
- DOUSSEAU, S. et al. Ecofisiologia da germinação de sementes de *Campomanesia pubescens*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 8, p. 1362-1368, ago. 2011.
- FERREIRA, M. B. Frutos comestíveis nativos do D.F.: gabiobas, pitangas e araçás. **Cerrado**, Brasília, v. 4 n. 18, p. 11-16, 1972.
- FERREIA, D. F. Sisvar a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, nov-dec. 2011.
- GERMANA, M.A. et al. Organogenesis and encapsulation of *in vitro*-derived propagules of Carrizo citrange [*Citrus sinensis* (L.) Osb. 9 *Poncirus trifoliata* (L.) Raf]. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Urbana, v. 106, n. 2 p. 299-307, feb. 2011.
- GUEDES, R.S.; COSTA, F.H.S.; PEREIRA, J.E.S. Características físicas e nutricionais da matriz de encapsulamento na produção de sementes sintéticas de pimenta-longa (*Piper hispidinervum* C. DC.). **Revista Árvore**, Viçosa, v. 31, n. 6, p. 1005-1011, nov./dez. 2007.
- HUNG, C.D.; TRUEMAN, S.J. Preservation of encapsulated shoot tips and nodes of the tropical hardwoods *Corymbia torelliana*, *C. citriodora* and *Khaya senegalensis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Urbana, v. 109, n. 2, p. 341-352, mai. 2012.
- KLAFKE, J. Z. et al. Effects of *Campomanesia xanthocarpa* on biochemical hematological and oxidative stress parameters in hypercholesterolemic patients. **Journal of Ethnopharmacology**, Leiden, v. 127, n. 2, p. 299-305, feb. 2010.
- KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. Conservation of the Brazilian Cerrado. **Conservation Biology**, Boston, v. 19, n. 3, p. 707-713, June 2005.
- LAMBARDI, M.; BENELLI, C.; OZUDOGRU, E.A. Synthetic seed technology in ornamental plants. In Teixeira da Silva JA (ed), *Floriculture, ornamental and plant biotechnology*. Global Science books. UK. 2:347-354, 2006.
- MACHADO, R. B. et al. **Estimativas de perda da área do Cerrado brasileiro**. Available at: <<http://www.conservation.org.br/arquivos/RelatDesmatamCerrado.pdf>>. Access in: 16 Apr. 2012.
- MACHADO, R. B. et al. Estimativas de perda da área do Cerrado brasileiro. **Relatório técnico**. Conservação Internacional, 2004.
- MISHRA, J. et al. Assessment of genetic fidelity of encapsulated microshoots of *Picrorhiza kurrooa*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Urbana, v. 104, n. 2, p. 181-186, feb. 2011.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Malden, v. 15, n. 3, p. 473-497, jul. 1962.
- PATTNAIK, S.; CHAND, P.K. Morphogenic response of the alginateencapsulated axillary buds from *in vitro* shoot cultures of six mulberries. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Urbana, v. 60, n. 3 p. 177-185, apr. 2000.
- PAVAN, F. R. et al. Evaluation of anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity of *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae). **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 5, p. 1222-1226, may. 2009.
- PEREIRA, J.E.S. et al. Composição da matriz de encapsulamento na formação e conversão de sementes sintéticas de pimenta-longa. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 26 n. 1, p. 93-96, jan./mar. 2008.
- REDENBAUGH, K.; FUJII, J.A.A.; SLADE, D. Hydrated coatings for synthetic seeds. In: Redenbaugh, K. (Ed.), **Synseeds – Application of Synthetic Seeds to Crop Improvement**, CRC Press, Boca Raton, p. 35-46, 1993.

- RIHAN, H.Z. et al. Encapsulation of cauliflower (*Brassica oleracea* var botrytis) microshoots as artificial seeds and their conversion and growth in commercial substrates. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Urbana, v. 107, n. 2, p. 243-25, nov. 2011.
- SANTOS, I. R. I. Criopreservação de germoplasma vegetal. **Biociência**, Brasília, v. 4, n. 20, p.60-65, may-jun. 2001.
- SENARATNA, T.; MCKERSIE, B.D.; BOWLEY, S.R. Artificial seeds of alfalfa (*Medicago sativa* L.). Induction of desiccation tolerance in somatic embryos. **In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Dordrecht, v. 26, n. 1, jan. 1990.
- SHARMA, S.; SHAHZAD, S.; SILVA, J.A.T. Synseed technology-A complete synthesis. **Biotechnology Advances**, Waterloo, v. 31, n. 2, p. 186-207, mar-apr. 2013.
- STANDARDI, A.; PICCIONI, E. Recent perspectives on synthetic seed technology using nonembryogenic *in vitro*-derived explants. **International Journal of Plant Sciences**, Chicago, v. 159, n. 6, p. 68-78, nov. 1998.
- SUNDARARAJ, S.G.; AGRAWAL, A.; TYAGI, R.K. Encapsulation for *in vitro* short-term storage and exchange of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) germplasm. **Scientia Horticulturae**, Mission, v. 125, n. 4 p. 761-766, 2010.
- TABASSUM, B. et al. Viability assessment of *in vitro* produced synthetic seeds of cucumber. **African Journal of Biotechnology**, Bowie, v. 9, p. 7026-7032, 2010.
- VINAGRE, A. S. et al. Anti-diabetic effects of *Campomanesia xathocarpa* (Berg) leaf decoction. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo, v. 46, n. 2, p. 169-177, 2010.