

Sementes Sintéticas e Unidades Encapsuláveis.

Guerra, Miguel Pedro¹; Dal Vesco, Lírio Luiz².

¹Prof. Titular, Programa de Pós Graduação em Recursos Genéticos Vegetais (PPG/RGV), Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal (LFDGV), Depto. Fitotecnia/CCA/UFSC – Florianópolis, SC, CEP 88034-001, Fone (48) 3721-5331, email: mpguerra@cca.ufsc.br. ²Doutorando do PPG/RGV/CCA/UFSC – Florianópolis, SC, 88034-001, Fone (48) 3721-5336, email: lirio@cca.ufsc.br;

INTRODUÇÃO

Sistemas avançados de cultivos e regeneração de plantas *in vitro* são alvos atuais de atenção por pesquisadores de todo o mundo. O fato é que os estudos e as aplicações da morfogênese *in vitro* de plantas oferecem oportunidades e inúmeras aplicações na biologia, botânica, bioquímica, propagação e melhoramento de plantas (Phillips, 2004). Os resultados buscados relacionam-se, principalmente, a identificação das rotas de controle da morfogênese *in vitro* e a otimização de protocolos regenerativos para cada espécie-alvo. O domínio e controle das rotas da morfogênese para cada recurso genético vegetal micropropagado é requisito fundamental para superar as dificuldades referentes à melhoria dos protocolos regenerativos *in vitro*.

Entre os avanços recentes nesta área citam-se o desenvolvimento das tecnologias de sementes sintéticas (SS) e de unidades encapsuláveis (UE). O emprego destes sistemas baseados na geleificação ionotrópica do alginato de sódio por sais de cálcio, ou encapsulamento em matriz de geleificação, em plantas é considerado como um dos avanços significativos para as técnicas de micropropagação. Estas técnicas são importantes também para a conservação *in vitro* de germoplasma.

Inicialmente, as pesquisas nesta área se concentravam no emprego de embriões somáticos (ES) para o desenvolvimento da técnica de semente sintética. Posteriormente passou-se a empregar propágulos não embriogênicos tais como ápices caulinares, segmentos nodais e outros (Pattnaik & Chand, 2000). Independentemente da técnica empregada um de seus objetivos é a superação dos problemas relacionados com a fragilidade dos propágulos, permitindo a semeadura ou transplante mecanizado (Mamiya & Sakamoto, 2001).

A tecnologia de sementes sintéticas foi empregada pioneiramente no Brasil no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal do Departamento de Fitotecnia do CCA/UFSC com o encapsulamento de embriões somáticos de *Feijoa sellowiana* (Guerra et al., 2001; Dal Vesco et al., 2005 e Cangahuala-Inocente et al., 2007). A tecnologia de unidades encapsuláveis foi inicialmente empregada em microbrotos da bananeira cv Grand Naine (Sandoval-Yugar, 2002) e de bromélias (Rech Filho, 2004). Estas técnicas são de uso restrito e recente no Brasil, principalmente, quando associadas semeaduras diretamente em substratos em condições *ex vitro*.

Sementes Sintéticas

No início da década de 70 T. Murashige já havia formulado o conceito de semente sintética, mas somente o apresentou formalmente em 1977 num simpósio sobre cultura de tecidos, realizado na Bélgica. Em 1986, foi organizado o primeiro simpósio sobre sementes sintéticas, em Davis na Califórnia, EUA, para esta tecnologia envolvendo discussões sobre o controle da maturação dos embriões zigóticos e embriões somáticos, produção em sistemas de biorreatores, encapsulamento e desidratação dos ES (Redenbaugh et al., 1988).

Dentre os métodos para a produção de sementes sintéticas, o mais empregado é a geleificação ionotrópica do alginato com íons cálcio, a qual se baseia no princípio de que o alginato de sódio complexado com um cátion bivalente forma alginato de cálcio, pela ligação iônica do cálcio ao grupo carboxílico do ácido gulurônico do alginato (Gray et al., 1987). A

tecnologia de aplicação da cápsula de hidrogel foi desenvolvida inicialmente por Redenbaugh et al. (1984) onde se descobriu que o alginato de sódio podia ser usado como matriz de geleificação para a produção de sementes sintéticas. Estes autores identificaram que os hidrogéis formados pelo alginato de sódio ou de potássio e complexados em CaCl_2 podiam ser empregados para a confecção das cápsulas.

O alginato de sódio é um produto extraído de algas marinhas marrons da classe Phaeophyceae. Atualmente, este composto tornou-se o principal gel para o encapsulamento devido a suas propriedades geleificantes, baixo custo, facilidade de uso, geleifica em temperatura ambiente e ausência de toxicidade. A partir disto, surgiram inúmeros estudos com esta tecnologia, incluindo o controle da maturação dos embriões zigóticos e somáticos, a produções de embriões em biorreatores, o encapsulamento e a desidratação dos embriões somáticos (Gray et al., 1987).

Semente sintética ou artificial é definida como um embrião somático, dessecado ou não, e encapsulado com ou sem um endosperma sintético, contendo nutrientes e, eventualmente, reguladores de crescimento e compostos antimicrobianos (Nieves et al., 1998). Assim, uma semente sintética apresenta estruturas análogas à semente verdadeira ou botânica, e consiste de um embrião somático envolto por uma ou mais camadas de compostos artificiais. Esta cápsula tem como finalidade a proteção do embrião somático contra danos mecânicos durante a armazenagem, transporte e semeadura diretamente em substratos (Gray & Purohit, 1991; Onishi et al., 1994). O alginato de sódio é um composto que apresenta boas características para o encapsulamento uma vez que possui boas propriedades geleificantes, é de baixo custo e apresenta facilidade de uso e ausência de toxicidade (Guerra et al., 1998). A definição original de semente sintética, dada por T. Murashige, foi a partir de um único embrião somático encapsulado, o qual poderia ser manipulado como uma semente verdadeira, permitindo desta forma o transporte, o armazenamento e a semeadura em ambiente *in vivo* ou, *ex vitro* e finalmente, desenvolver converte estas cápsulas em plantas completas. No entanto, esta definição limitou-se ao emprego de ES, que são propágulos bipolares regenerados a partir da embriogênese somática e contidos em uma cápsula que permitiria a manipulação e a semeadura direta (Standardi & Piccioni, 1998).

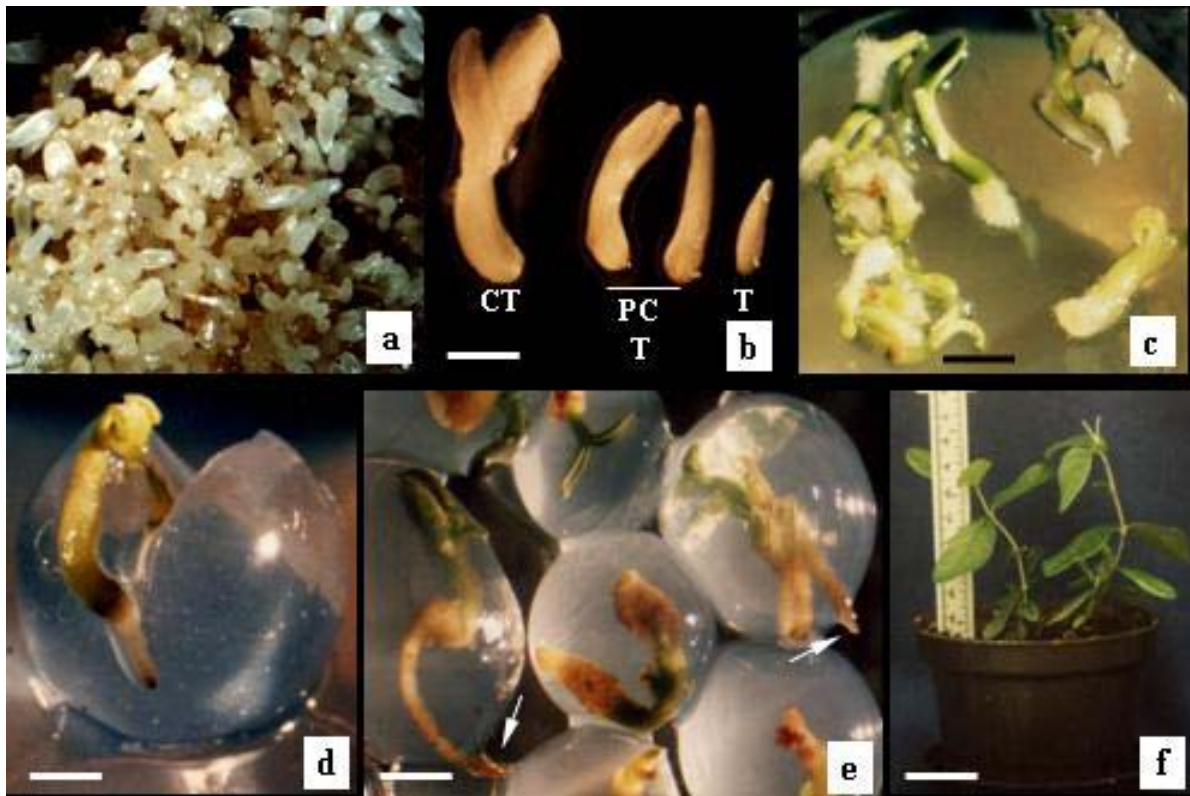
A tecnologia de sementes sintéticas surgiu como uma ferramenta promissora no micropropagação de plantas, tendo em vista sua eficácia e potencial de redução de custos (Pattnaik & Chand, 2000). A consolidação de protocolos onde os fatores de economia e tempo estão diretamente ligados ao sucesso da produção em escala de propágulos tem sido alvo de vários estudos (Redenbaugh et al., 1984, 1988, Gray et al., 1987; Onishi et al., 1992; Onishi et al., 1994; Sakamoto et al., 1995; Guerra et al., 2001, Dal Vesco et al., 2005, Singh et al., 2006, Cangahuala-Inocente et al., 2007 e Mallón et al., 2007). Os mais bem sucedidos casos de produção de semente sintética e regeneração de plantas já foram documentados para as mais diversas espécies de cereais, hortaliças, frutíferas, ornamentais, aromáticas e coníferas (Pattnaik & Chand, 2000).

A produção de sementes sintéticas apresenta uma série de atributos favoráveis: a) baixo custo em produções de grandes volumes associado ao uso de biorreatores em pequenas áreas e em curto espaço de tempo; b) mantém a fidelidade clonal; c) permite o armazenamento; d) permite a semeadura direta a campo, sem aclimatização; e) reduz o custo baixo custo por planta uma vez que podem ser eliminadas as etapas de sementeira e viveiros (Redenbaugh et al., 1988; Gray et al., 1995; Guerra et al., 1998).

A indução de culturas embriogênicas de alta frequência (Figura 1) é rotineiramente obtida na fruteira nativa goiabeira-serrana (*Acca sellowiana*, syn. *Feijoa sellowiana*, Myrtaceae) no LFDGV/FIT/CCA/UFSC (Dal Vesco et al., 2005, Cangahuala-Inocente et al., 2007). O uso de uma solução de alginato de sódio (1-3%) complexado em CaCl_2 (50-100 mM) resulta na formação de cápsulas consistentes e um tratamento posterior com KNO_3 (100-200 mM) permite a abertura da cápsula e a sua conversão em plântula completa (Figura 1d-f). A utilização de um endosperma artificial pode melhorar a taxa de conversão em plântulas (Cangahuala-Inocente et al., 2007)

Unidades encapsuláveis

O estabelecimento do conceito de unidade encapsulável foi inicialmente relatado por Onishi et al. (1992) abrangendo o sistema de produção de semente sintética a partir de embriões de aipo encapsulados e a habilidade de conversão em condições não estéreis. Posteriormente, Sakamoto *et al.* (1995) definiu esta técnica relacionada ao emprego de qualquer propágulo capaz de ser convertido em plântulas normais. Uma característica importante no conceito de UE é de que os propágulos devem apresentar tamanho no limite do encapsulamento (até 8 mm), possuir vigorosa habilidade de conversão em condições ambientais normais e apresentar tolerância contra o estresse na manipulação dos propágulos (Onishi et al., 1992; Sakamoto et al., 1995).



Fonte: Dal Vesco et al. (2005).

Figura 1. Embriogênese somática e produção de sementes sintéticas (SS) de *F. sellowiana*: a) indução em alta frequência (barra 1.1mm), b) Embriões somáticos (ES) nos estádios torpedo (T) e pré-cotiledonar (PCT) revelam maiores taxas de conversão quando comparados com os ES encapsulados no estágio cotiledonar (CT) (barra 1.1mm); c) Embriões somáticos pré-germinados em meio de cultura LPm + BAP (0,5 μ M) e GA₃ (0,1 μ M) (barra 2.6mm) encapsulados em solução de alginato de sódio (1%) com CaCl₂ (100mM), suplementado com endosperma sintético constituído por sais da formulação LPm (meia-força) + GA₃ (0.05 μ M) + Kin (0.5 μ M) + Caseína hidrolisada (500 mg/l) + Vitaminas de Morel (Morel & Vetmore, 1951) e; d) A imersão da cápsula em solução de KNO₃ (200 mM) resulta na descomplexação, abertura da cápsula e conversão dos ES em plântulas (barra 1.3mm); e) Cápsulas imersas em água mantêm consistência firme, sendo necessário a emissão da radícula (ver detalhe - setas) para o rompimento da cápsula (barra 2.6mm); f) Mudanças aclimatizadas transferidas para vasos e mantidas em fitotron mostrando excelente vigor (barra 3.1cm).

Um dos primeiros trabalhos publicados e que apontou com sucesso o uso da técnica de encapsulamento de gemas axilares foi relatado por Bapat et al. (1987) a partir de segmentos de brotos de amora (*Morus indica*) cultivados *in vitro*. Com esta mesma espécie

Bapat & Rao (1990) incorporaram na matriz de alginato diferentes fungicidas e trabalharam sob condições não assépticas. O uso de protetores na matriz da cápsula é fundamental para aumentar a taxa de conversão das gemas em brotos.

A unidade encapsulável (UE) é uma derivação do tema semente sintética, cujo princípio fundamental é ter alta capacidade conversão ou de retomada do crescimento, o que significa romper a cápsula e formar uma planta completa (Mamiya & Sakamoto, 2001). O uso desta técnica apresenta vantagens porque permite o estabelecimento de pequenos propágulos diretamente em substratos, nas condições *ex vitro* em casa de vegetação, telados ou a campo, em estágios mais precoces do que nos outros sistemas de micropropagação (Piccioni & Standardi, 1995, Sakamoto et al., 1995). Desta forma é possível a aclimatização e o crescimento inicial diretamente em substratos ou com adaptações para suportar as condições de campo, bem como o armazenamento e transporte dos propágulos com alta viabilidade (Piccioni & Standardi, 1995; Standardi & Piccioni, 1998). Porém, uma das maiores dificuldades desta técnica, segundo vários autores, é o estabelecimento de protocolos que possibilitam encapsular brotos derivados de sistemas organogénéticos *in vitro* e que apresentam capacidade de sobreviver em condições de ambiente não estéril. As fontes de explantes utilizadas com maior frequência são segmentos de brotos contendo o meristema apical, eixos caulinares unipolares ou segmentos nodais, geralmente obtidos a partir de culturas estabelecidas *in vitro* (Sarkar & Naik, 1998, Singh et al., 2006). As aplicações desta tecnologia permitem a consolidação protocolos em biofábricas onde os fatores economia e tempo está diretamente ligado ao sucesso da produção de mudas em escala comercial (Standardi & Piccioni, 1998, Singh et al., 2006). Esta tecnologia permite ainda a eliminação de etapas da cultura *in vitro* por possibilitar o enraizamento em condições *ex vitro* (Singh et al., 2006).

O uso de propágulos unipolares derivados das culturas *in vitro*, especialmente em espécies micropropagadas por outras rotas morfogénéticas que não a embriogênese somática foi abordada por Standardi e Piccioni (1998). Para estes autores três tipos de propágulos podem ser utilizados: 1) Propágulo unipolar natural, que são os microbulbos, microtubérculos, microbrotos e rizomas; 2) Segmentos de brotos, ou micro-estacas, que são os segmentos nodais contendo a gema apical ou axilar e; 3) Propágulos diferenciais, que são os tecidos e órgãos imaturos, tais como os meristemóides, agregados de células e primórdios de gemas. Todas estas estruturas, também podem ser consideradas como UE quando apresenta tamanho adequado para manipulação, viabilidade de conservação e de conversão em planta completa.

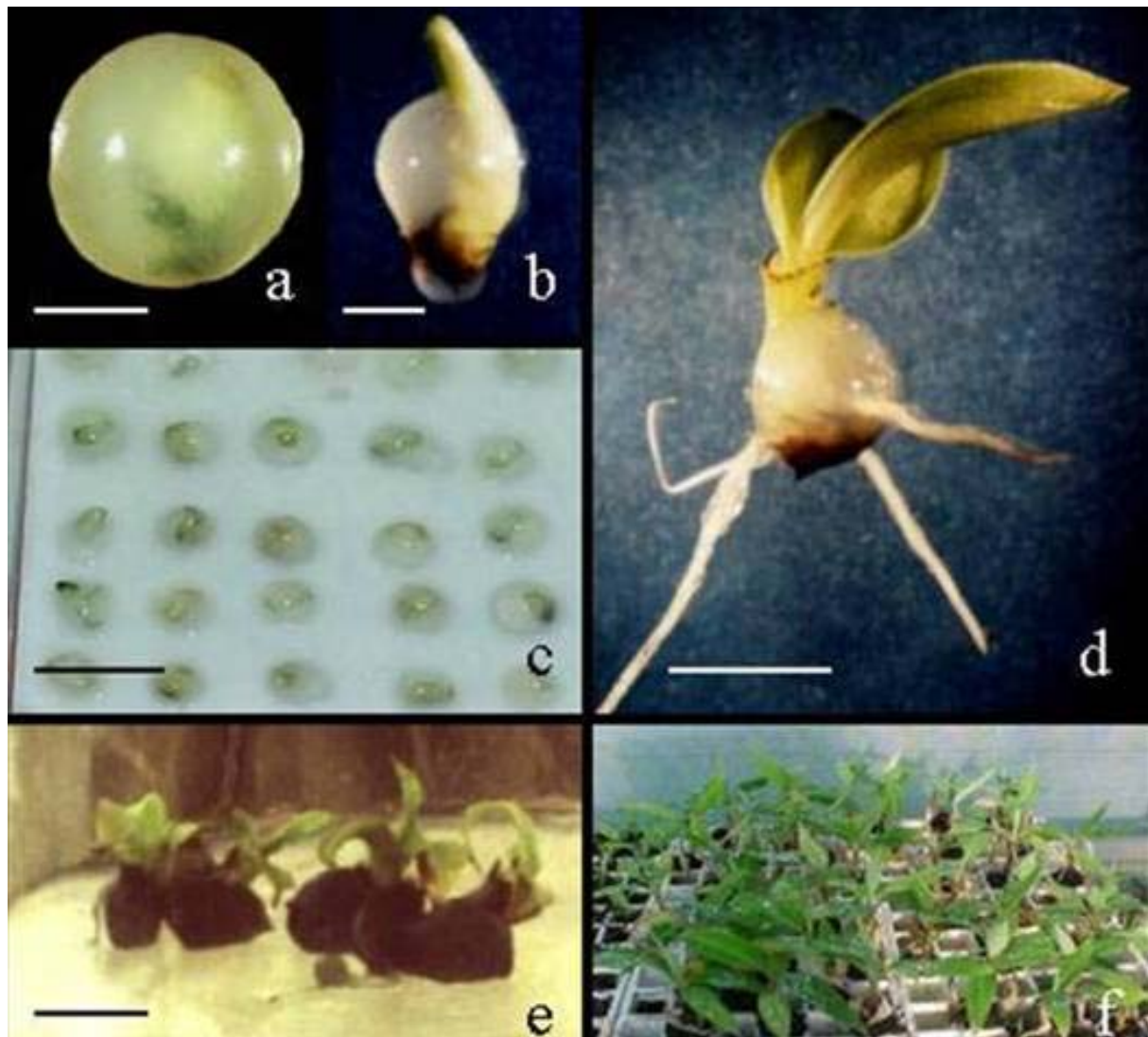
Alguns trabalhos indicam que as condições de cultivo que antecedem ao encapsulamento ou a transferência para *in vivo* afetam a eficiência da técnica. Em UE de aipo, a percentagem de conversão foi de 25% em casa de vegetação e de 45% quando a atmosfera do biorreator foi enriquecida com 2% de CO₂ (Onishi et al., 1992). Já em sistemas automatizados, por meio do uso de um aparato encapsulador, Sakamoto et al. (1995) obtiveram 52% de conversão das UE contendo embriões somáticos de cenoura após a descomplexação das cápsulas com KNO₃ (200 mM), as quais foram posteriormente semeadas diretamente em substratos sob ambiente controlado. A percentagem de conversão das UE contendo embriões somáticos de aspargo foi de 72% em substrato não estéril (Mamiya & Sakamoto, 2001).

Estudos referentes ao encapsulamento de gemas micropropagadas de espécies lenhosas foram realizados com sucesso para seis espécies frutíferas perenes resultando em 100% de viabilidade, porém o rebrotamento dependeu do meio de cultivo (Piccioni & Standardi, 1995). Para o porta-enxerto de macieira M.26, alto potencial regenerativo foi observado com o encapsulamento de pequenos segmentos de brotos com gemas axilares e da região apical (Piccioni, 1997).

A possibilidade de se obter a conversão ou re-crescimento dos propágulos em condições *ex vitro* tem motivado a execução de estudos com a suplementação nutritiva na matriz de alginato de sódio. Neste aspecto, alguns trabalhos apontam que a matriz de alginato deve ser aperfeiçoada de acordo com o tipo de propágulo e espécie utilizada quanto às quantidades efetivas de macro e micro nutrientes a serem utilizados (Sakar &

Naik, 1998; Pattnaik & Chand, 2000; Nyende et al., 2003; Naik & Chand, 2006 e Singh et al., 2006).

Neste sentido, um melhoramento efetivo no estudo de formação da cápsula matriz de UE foi obtido em diversas espécies. O encapsulamento de brotações de bananeira resultou em uma taxa de conversão de 100% (Ganapathi et al., 1992). Técnicas desenvolvidas no LFDGV/FIT/CCA/UFSC mostraram que microbrotos de bananeira cv. Grand Naine, cuja cápsula matriz foi enriquecida com o meio de cultura MS tiveram o processo de conversão melhorado (Figura 2). Adicionalmente, a adição de carvão ativado e o uso de fungicida Benomyl à matriz de alginato diminuíram a oxidação e a contaminação dos microbrotos, respectivamente (Sandóval-Yugar, 2002).



Fonte: Sandóval-Yugar, (2002).

Figura 2. Processo de conversão de unidades encapsuláveis de *Musa sp* cv. Grand Naine. a) Microbroto encapsulado no sistema de dupla camada (Barra 5 mm); b) Microbroto encapsulado em conversão (Barra 3 mm); c) Microbrotos encapsulados em processo de conversão *ex vitro* em placas gerbox (Barra 3 cm); d) Detalhe de unidade encapsulável bipolar convertida *in vitro* (Barra 1 cm); e) Unidades encapsuláveis convertidas *in vitro* (Barra 2 cm); f) Microbrotos encapsulados e pré-convertidos *in vitro* em processo de aclimação

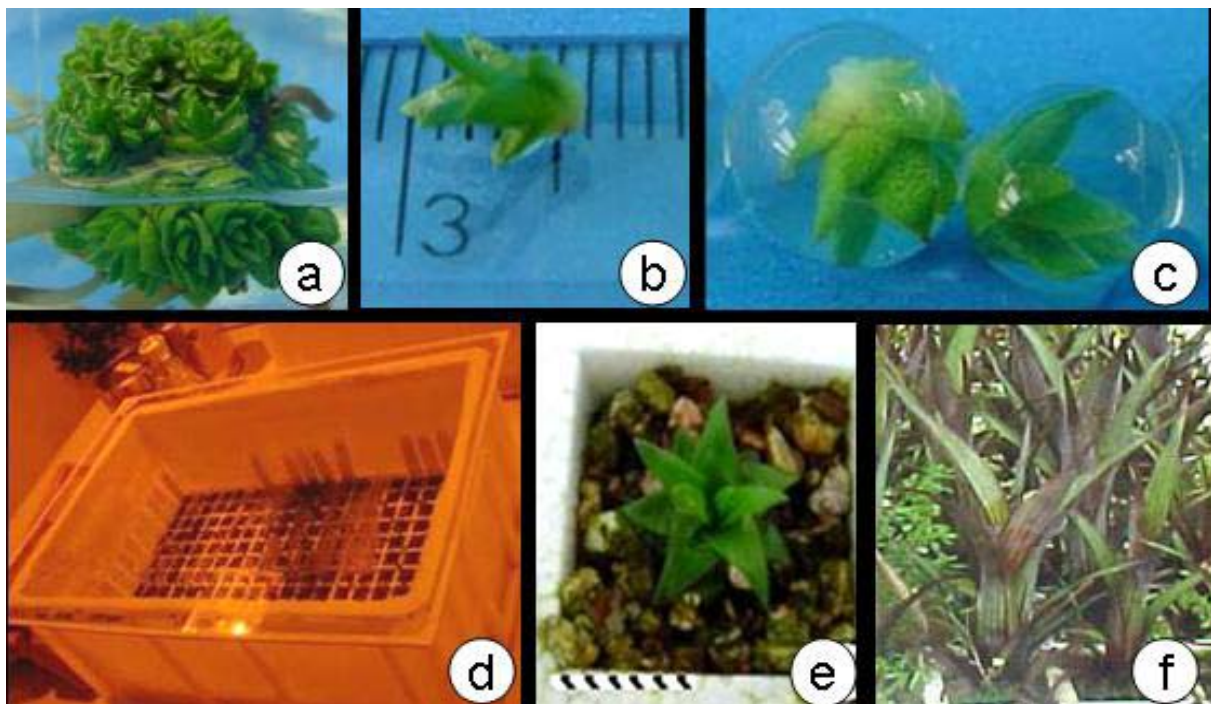
Microbrotos de abacaxizeiro encapsulados em matriz de alginato enriquecida com sais e vitaminas do meio MS, mio-inositol e sacarose, apresentaram 100% de conversão em

meio de cultura MS e quando transferidas a campo foram estabelecidas com sucesso (Soneji et al., 2002). Ainda em bromélias, uso do PBZ em meio de cultura foi eficaz na indução de microbrotos de *Vriesea gigantea* (Figura 3) e *V. fosteriana* (Figura 4). A formação de UE pelo encapsulamento em matriz de alginato permitiu, com sucesso, o estabelecimento *ex vitro* de bromélias em fitotron. Além disto, este procedimento promoveu um incremento no número de folhas nas plantas aclimatizadas (Figura 3, 4), quando são comparadas com o uso de microbrotos não encapsulados (Rech Filho, 2004).

Encapsulamento e Conservação de Germoplasma

Uma vantagem adicional do encapsulamento de propágulos vegetativos se relaciona com a conservação das plantas elites ou ameaçadas. A conservação de germoplasma *in vitro* tem como base o estabelecimento de condições que permitem minimizar a taxa de crescimento o que, geralmente é feito por meio da redução da temperatura no ambiente das culturas e/ou com o uso de retardantes de crescimento (Maruyama et al., 1997).

O método de encapsulamento associado ao armazenamento a frio apresenta vantagens na preservação de grande quantidade de material vegetal em condições controladas e em pequeno espaço físico (Figura 5). Além disto, a conservação de germoplasma *in vitro* minimiza a erosão genética (Maruyama et al., 1997, West et al., 2006) e permite a troca de materiais genéticos entre laboratórios de diferentes instituições (Pattnaik & Chand, 2000, Singh et al., 2006).



Fonte: Rech Filho (2004).

Figura 3. Unidades encapsuláveis de *V.gigantea*: a) microbrotos aos 100 dias em meio de cultura MS suplementado com ANA (2 μ M), BAP (4 μ M) e PBZ (4 μ M); b) Microbroto individualizado; c) Microbrotos encapsulados em matriz de alginato de sódio (2%) suplementado com $\frac{1}{2}$ dos sais de MS; d) Transplante das UE para bandejas com substrato vermiculita e acondicionadas em caixas plásticas com tampa de vidro em fitotron; e) aclimatização e desenvolvimento das muda aos 12 dias e; f) mudas aclimatizadas aos 100 dias de cultivo em túnel com irrigação intermitente. Barra: 1cm.

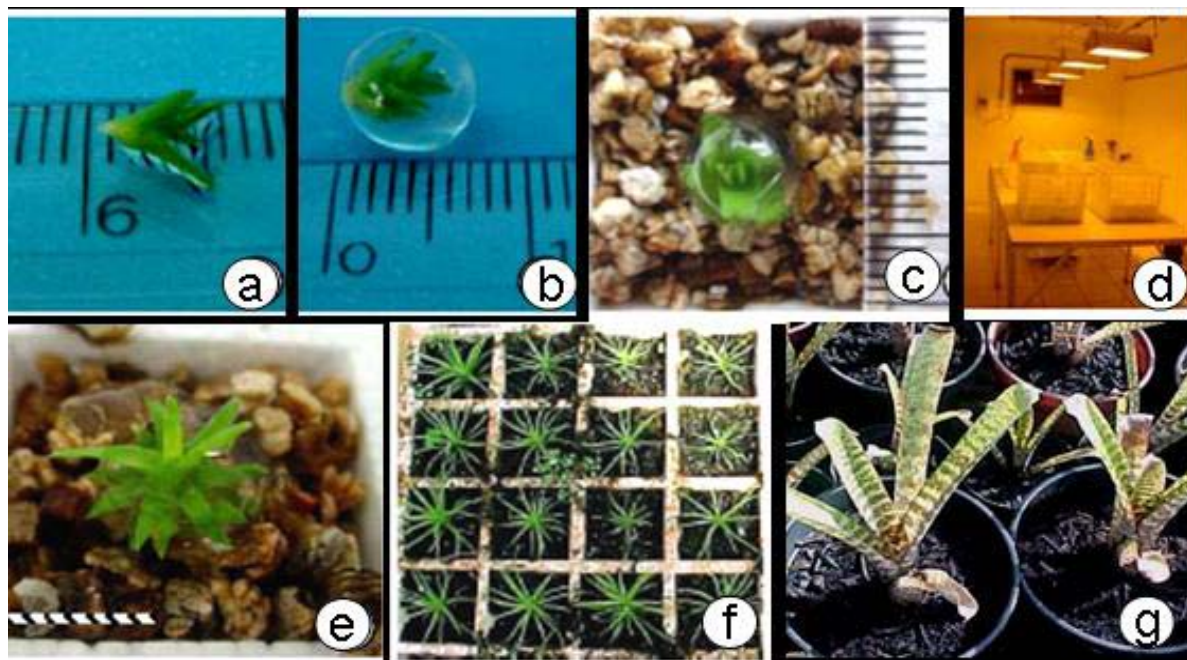
Vários trabalhos são encontrados na literatura recente associando a técnica de UE com a conservação de germoplasma por meio da criopreservação (West et al., 2006). A alta

freqüência de regeneração ou de re-crescimento a partir de brotações apicais justifica o emprego desta técnica como um novo sistema de plantio, de troca de germoplasma e armazenamento superando assim os problemas decorrentes da exposição prolongada destas brotações a condições desfavoráveis de sobrevivência (Narula et al., 2007).

A criopreservação tem sido foco de muitos trabalhos e uma das pressuposições da manutenção em baixas temperaturas é a não ocorrência de alterações fenotípicas e genéticas no material vegetal (Hirai & Sakai, 2003). Os avanços desta técnica incluem o emprego de metodologias desidratação e encapsulamento, os quais são considerados como pré-tratamentos fundamentais para o sucesso da criopreservação (Steinmacher et al., 2007).

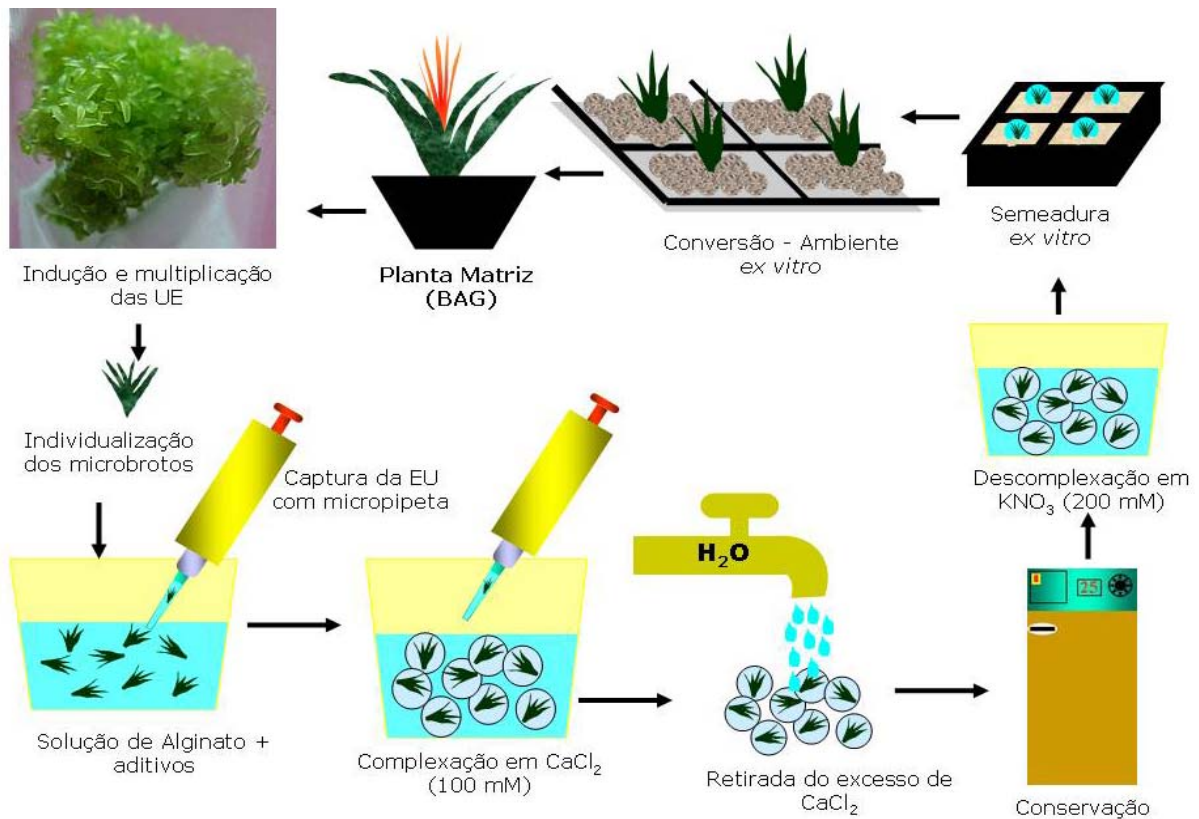
Estas técnicas utilizam o princípio do encapsulamento incorporando estruturas vegetativas em uma matriz de alginato e possibilitando, assim, a conservação da viabilidade por longos períodos de tempo (Maruyama *et al.*, 1997). A técnica do hidrogel de alginato possibilita imobilizar e manter a viabilidade dos propágulos, proporcionando um ambiente atóxico e permitindo mudanças abruptas de temperatura e de pH sem afetar material biológico (Mallón et al., 2007).

O uso de adjuvantes na cápsula matriz pode permitir tanto a conservação da viabilidade do propágulo quanto à redução gradativa dos processos metabólicos, permitindo um aumento da resistência às baixas temperaturas. É recomendado também, um pré-tratamento com ABA ou a adição de manitol ou paclobutrazol (PBZ) na cápsula matriz, para aumentar a tolerância à desidratação e às baixas temperaturas. A desidratação é considerada um passo crítico para a manutenção da viabilidade e integridade das células e por evitar a formação de cristais de gelo (Engelmann, 2004). Uma das condições ótimas para recuperação dos embriões zigóticos de pupunha criopreservados incluem o encapsulamento e desidratação para 20% conteúdo de água (Steinmacher et al., 2007).



(Rech Filho, 2004).

Figura 4. Unidades encapsuláveis de *V. fosteriana*: a) Microbrotos individualizados e induzidos em meio de cultura MS suplementado com PBZ (4 μ M); b) Microbroto encapsulado em matriz de alginato de sódio (2%) suplementado com $\frac{1}{2}$ dos sais de MS; c) UE transplantada em substrato vermiculita; d) UE mantidas em fitotron; e) Conversão das UE após 25 dias; f) Mudras transplantadas e cultivadas em substrato composto por casca de arroz carbonizada (50%) e suplemento mineral Turfa Fértil (50%) e mantidas em túnel com irrigação intermitente e; g) Transplante para vasos e mantidas em casa de vegetação. Barra: 1cm.



Fonte: Adaptado de Rech Filho (2004).

Figura 5. Representação esquemática do protocolo de UE a partir de microbrotos de bromélias no LFDGV/UFSC.

Várias inovações têm sido aplicadas à técnica de encapsulamento (Figura 6) tais como o estabelecimento do sistema de encapsulamento em cápsulas farmacêuticas (Dupuis et al., 1994). Outras inovações como a cápsula em dupla camada (Figura 7) foi sugerida por Patel et al. (2000). Esta técnica consiste em suspender o material vegetal em solução de carboximetilcelulose e complexar em CaCl_2 sobre uma solução de alginato de sódio em agitação, resultando na formação de uma cápsula com matriz interna líquida. Esta técnica foi testada com cenoura por estes autores e resultou em 100% de emissão de radícula das unidades encapsuladas.

O uso das técnicas de encapsulamento de estruturas vegetativas é considerado de baixo custo. Esta técnica tem demonstrado ser promissora para a conservação de germoplasma de espécies ameaçadas, especialmente aquelas que são intolerantes às baixas temperaturas como o musgo *Splachnum ampullaceum* (Mallón et al., 2007).

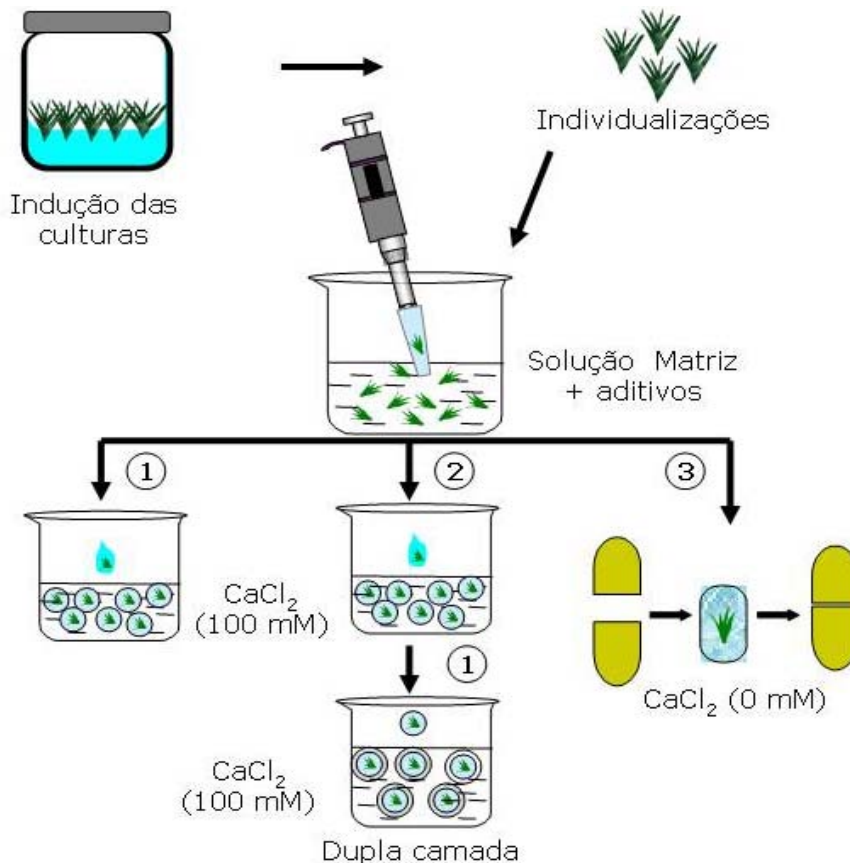
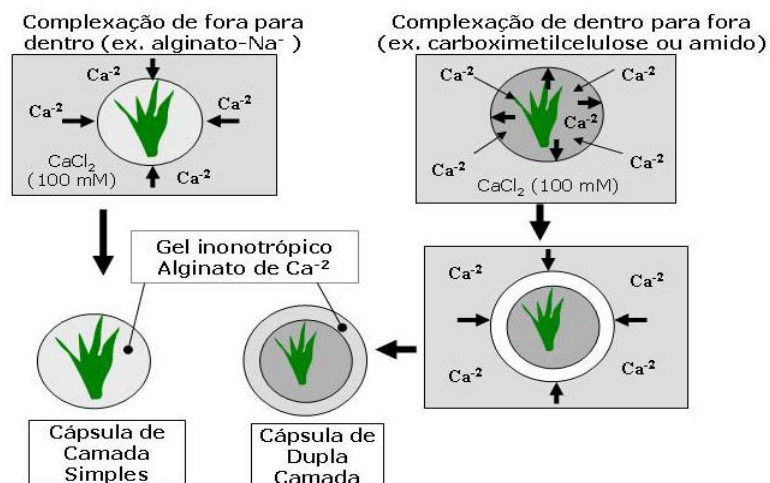


Figura 6. Representação esquemática para a confecção da matriz da cápsula por diferentes sistemas: (1) Alginato de sódio complexado em CaCl_2 (Onishi et al., 1994); (2) cápsula do tipo dupla camada: interna de carboximetilcelulose ou amido complexando de “dentro para fora” em CaCl_2 e camada externa de alginato de cálcio (Patel et al., 2000) e; (3) cápsulas farmacêuticas (Dupuis et al., 1994) com matriz de alginato ou amido.



Fonte: Adaptado de Patel et al. (2000).

Figura 7. Representação esquemática da formação de camada simples x dupla camada na formação do gel inotrópico de alginato de cálcio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAPAT, VA; MATHRE, M, RAO, PS. Propagation of *Morus indica* L. (Mulberry) by encapsulated shoot buds. **Plant Cell Rep.** v.6, p.393–395, 1987.
- BAPAT, V.A.; RAO, P.S. *In vivo* growth of encapsulated axillary buds of mulberry (*Morus indica* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 20, p.69–70, 1990.
- CANGAHUALA-INOCENTE, G. C.; DAL VESCO, L. L.; STEINMACHER, D.A., GUERRA, M. P. Somatic embryogenesis in pineapple guava (*Feijoa sellowiana* Berg): Induction, Conversion and Artificial Seeds. **Scientia Horticulturae.** v.111, p. 228–234, 2007.
- DAL VESCO, L. L.; TORRES, A. C.; NODARI, R.O.; GUERRA, M.P. Regulation of somatic embryogenesis in *Feijoa sellowiana* Berg and the technology of synthetic seeds. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v.1, n.1, p.37 - 46, 2005.
- DUPUIS, J-M.; ROFFAT, C.; Derose, R.T.; MOLLE, F. Pharmaceutical capsules as a coating system for artificial seeds. **Bio/Technology**, v.12, p.385-389, 1994.
- ENGELMANN, F. Plant cryopreservation: progress and prospects. **In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant**, v. 40, p.427–433, 2004.
- GANAPATHI, T. R.; SUPRASANNA, P.; BAPAT, V.A.; RAO, P.S. Propagation of banana through encapsulated shoot tips. **Plant Cell Reports**, v. 11, p.571-575, 1992.
- GRAY, DJ, COMPTON, ME; HARRELL, RC; CANTLIFFE, DJ. Somatic embryogenesis and the technology of synthetic seed. In: BAJAJ, YPS (Ed.) **Biotechnology in Agriculture and Forestry, Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed I.** Berlin, Heidelberg Springer, v. 30, p. 127–151, 1995.
- GRAY, D.J.; Stepan-Sarkissian; FOWLER, M.W. Biochemistry of forest tree species in culture In.: BONGA, J.M; DURZAN, D. J. **Cell and Tissue culture in Forestry.** v.2, Dordrecht: Martinus Nijhoff Pu. p.31-60, 1987.
- Gray, D.J.; Purohit, A. Somatic embryogenesis and development of synthetic seed technology. **Critical Reviews in Plant Sciences.** v.10, p.33–61, 1991.
- Guerra, M. P.; Dal Vesco, L.L.; Ducroquet, J.P.H.J.; Nodari, R.O.; Reis, M.S. Somatic embryogenesis in *Feijoa sellowiana*: Genotype Response, Auxinic shock and Synthetic Seeds. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.13, n.2, p.117–128, 2001.
- Guerra, M. P.; Torres, A. C.; Teixeira, J. B. Embriogênese Somática e Sementes Sintéticas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A (Eds). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**, Brasília: Embrapa, v.2, p.533–568, 1998.
- HIRAI, D.; SAKAI, A. Simplified cryopreservation of sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] by optimizing conditions for osmoprotection. **Plant Cell Rep**, v.21, p.961–966, 2003.
- MALLÓN, R.; BARROS, P.; LUZARDO, A.; GONZÁLEZ, M.L. Encapsulation of moss buds: an efficient method for the in vitro conservation and regeneration of the endangered moss *Splachnum ampullaceum*. **Plant Cell Tiss Organ Cult.** v. 88, p. 41–49, 2007.
- MAMIYA, K.; SAKAMOTO, Y. A method to produce encapsulatable units for synthetic seeds in *Asparagus officinalis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.64, p.27–32, 2001.

MARUYAMA, E.; KINOSHITA, I.; ISHII, K.; OHBA, K.; SAITO, A. Germoplasm 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, p.393-396, 1997.

NAIK, S.K.; CHAND, P. K. Nutrient-alginate encapsulation of in vitro nodal segments of pomegranate (*Punica granatum* L.) for germplasm distribution and exchange **Scientia Horticulturae**, v.108, p. 247–252, 2006.

NARULA, A.; KUMAR, S.; SRIVASTAVA, P. S. Genetic fidelity of in vitro regenerants, encapsulation of shoot tips and high diosgenin content in *Dioscorea bulbifera* L., a potential alternative source of diosgenin. **Biotechnol. Letters**, v. 29, p.623–629, 2007.

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, Tissue and Organ Culture**, v.54, p.77–83, 1998.

NYENDE, A.B.; SCHITTENHELM, S.; MIX-WAGNER, G.; GREEF, G-M. Production, storability, and regeneration of shoot tips of potato (*Solanum tuberosum* L.) encapsulated in calcium alginate hollow beads, **In Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant**, v.39, p.540–544, 2003.

ONISHI, N.; MASHIKO, T.; OKAMOTO, A. Cultural system producing encapsulatable units of synthetic seeds in celery. **Acta Hort** v.319, p.113-118, 1992.

ONISHI, N.; SAKAMOTO, Y.; HIROSAWA, T. Synthetic seeds as an application of mass production of somatic embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.39, p. 137–145, 1994.

PATEL, A.V.; PUSCH, I.; MIX-WAGNER, G.; VORLOP, K.D. A novel encapsulation technique for the production of artificial seeds. **Plant Cell Reports**. v. 19, p.868–874, 2000.

PATTNAIK, S.; CHAND, P.K. Morphogenic responses of the alginate-encapsulated axillary buds from *in vitro* shoot cultures of six mulberries. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.60, p.177-185, 2000.

PHILLIPS, G.C. Invited review: in vitro morphogenesis in plants – recent advances. **In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant**, v.40, p.342–345, 2004.

PICCIONI, E. Plantlets from encapsulated micropropagated buds of M.26 apple rootstock. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.47, p.225-260, 1997.

PICCIONI, E.; STANDARDI, A. Encapsulation of micropropagated buds of six wood species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.42, p.221-226, 1995.

RECH FILHO, A. Biorreatores de imersão temporária e unidades encapsuláveis como ferramentas na consolidação de protocolos de micropropagação de bromélias. 2004, 74f. **Dissertação**. (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) - CCA/UFSC, 2004.

REDENBAUGH, K.; FUJII, J. A.; SLADE, D. Encapsulated plant embryos. In: MIZRAHI, A. **Biotechnology in agriculture**, v. 9, p. 225-248, 1988.

REDENBAUGH, K.; NICHOL, J. KOSSLER, M.E.; PAASCH, B. Encapsulation of somatic embryos for artificial seed production. **In Vitro Cell Dev. Biol.**, v.20, p.256, 1984.

SAKAMOTO, Y.; ONISHI, N.; HIROSAWA, T. Delivery systems for tissue culture by encapsulation. In: FENNZ, A.; TOYOKI, C.; SCHMIT, M. A.; AITKEN-CHRISTIE, J.; KOZAI, T.; SMITH, M.L. (Eds). **Automation and environmental control in plant tissue culture**, Dordrecht Boston London: Kluwer Academics Publishers, 1995. p.215-243.

SANDÓVAL-YUGAR, E.W. **Elucidação dos pontos de controle da morfogênese e otimização de protocolos regenerativos *in vitro* de *Musa sp.* Cv. Grand Naine**. 2002, 115f. Dissertação. (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) - CCA/UFSC, 2002.

SARKAR, D.; NAIK, P. S. Synseeds in potato: an investigation using nutrient-encapsulated in vitro nodal segments. **Scientia Horticulturae**, v. 73, p. 179–184, 1998.

SINGH, A.K.; SHARMA, M.; VARSHNEY, R.; AGARWAL, S.S.; BANSAL, K.C. Plant regeneration from alginate-encapsulated shoot tips of *Phyllanthus amarus* Schum and Thonn, a medicinally important plant species. **In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant**, v.42, p.109–113, 2006.

SONEJI, J.R.; RAO, P.S.; MHATRE, M. Germination of synthetic seeds of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.) **Plant Cell Reports**, v.20, p.891-894, 2002.

STANDARDI, A.; PICCIONI, E. Recent perspectives on synthetic seed technology using nonembryogenic in vitro-derived explants. **International Journal of Plant Sciences**. v.159, p.968-978, 1998.

STEINMACHER, D.A.; SALDANHA, C.W.; CLEMENT, C.R.; GUERRA, M.P. Cryopreservation of peach palm zygotic embryos. **CryoLetters**, v.28, n.1, p.13-22, 2007.

WEST, T.P.; RAVINDRA M. B.; PREECE, J.E. Encapsulation, cold storage, and growth of *Hibiscus moscheutos* nodal segments. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, v.87, p.223–231, 2006.

PALAVRAS CHAVE:

Semente sintética, Unidades Encapsuláveis, Micropropagação.