

Qualidade de luz e fitorreguladores na multiplicação e enraizamento *in vitro* da amoreira-preta 'Xavante'

Light quality and growth regulators on *in vitro* multiplication and rooting of blackberry 'Xavante'

Mateus da Silveira Pasa^{1*} Geniane Lopes Carvalho¹ Márcia Wulff Schuch¹ Juliano Dutra Schmitz¹
Marcela de Melo Torchelsen¹ Gabriela Kaltbach Nickel¹ Laura Reisdorfer Sommer¹
Thaís Santos Lima¹ Samila Silva Camargo¹

RESUMO

A técnica de micropropagação apresenta diversas vantagens em relação aos métodos tradicionalmente utilizados na propagação da amoreira-preta, especialmente quanto à maior sanidade das mudas e maior rapidez na obtenção de novas plantas. O objetivo deste trabalho foi verificar a influência dos fitorreguladores 6-benzilaminopurina (BAP) e ácido indolbutírico (AIB), aliados à qualidade de luz, na multiplicação e enraizamento *in vitro*, respectivamente, da amoreira-preta cultivar 'Xavante'. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado. Os tratamentos constituíram-se de diferentes níveis de qualidade de luz (azul, vermelha, branca e ausência de luz) combinadas com ausência ou presença dos fitorreguladores AIB (0,5mg L⁻¹) e BAP (0,8mg L⁻¹) no meio de cultivo. A utilização de BAP aumenta o número de brotações, gemas e folhas da amoreira-preta 'Xavante' e, dessa forma, é indicada para sua multiplicação *in vitro*. A utilização de AIB não é necessária no enraizamento *in vitro* da amoreira-preta 'Xavante', indicando que essa cultivar apresenta bom enraizamento natural.

Palavras-chave: *Rubus* sp., fitorreguladores, propagação vegetativa, produção de mudas.

ABSTRACT

There are a lot of advantages using micropropagation technique over the methods traditionally used in blackberry propagation especially concerning health of seedlings and speed in getting new plants. The aim of this study was to investigate the influence of bioregulators 6-benzylaminopurine (BAP) and indol-3-butyric acid (IBA) combined with light quality on *in vitro* multiplication and rooting, respectively, of blackberry 'Xavante'. The experimental design was completely randomized. The treatments consisted of different levels of light quality (blue, red, white and absence of light) combined with the absence or presence of bioregulators

IBA (0.5mg L⁻¹) and BAP (0.8mg L⁻¹) in the culture medium. The use of BAP increases the number of new shoots, buds and leaves of blackberry, 'Xavante' and thus is suitable for its *in vitro* propagation. The use of IBA is not required in *in vitro* rooting of the blackberry cultivar studied, showing that it is naturally well rooting.

Key words: *Rubus* sp., bioregulators, vegetative propagation, seedling production.

INTRODUÇÃO

A amoreira-preta (*Rubus* sp.) é uma das espécies frutíferas mais promissoras no país, apresentando boas perspectivas de cultivo e comercialização. O cultivo da amoreira-preta tem apresentado sensível crescimento na área cultivada nos últimos anos no Brasil, principalmente na região Sul, e tem elevado potencial para os demais estados de características climáticas semelhantes (CAMPAGNOLO & PIO, 2012a). Dentre as cultivares recomendadas para o plantio, 'Xavante' é uma das mais promissoras, pelo fato de sua baixa necessidade de frio, boa produção e pela ausência de espinhos (RASEIRA et al., 2004). Esta característica é muito importante, pois facilita o manejo da cultura, principalmente por ocasião da colheita e na poda das plantas (CAMPAGNOLO & PIO, 2012b).

A propagação da amoreira-preta pode ser feita por meio de estacas de raízes, por ocasião do repouso vegetativo, quando são preparadas e transplantadas em sacos plásticos, ou através de rebentos originados das

¹Departamento de Fitotecnia, sala 1, CP 354, 96010-900, Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), Pelotas, RS, Brasil. E-mail: mateus.pasa@gmail.com. *Autor para correspondência.

plantas cultivadas. Além disso, segundo VILLA et al. (2003), a formação de mudas utilizando estacas lenhosas também é viável. No entanto, a técnica de micropropagação apresenta diversas vantagens em relação aos métodos tradicionalmente utilizados na propagação de amoreira-preta, especialmente quanto à maior sanidade das mudas (LEITZKE et al., 2009).

No processo de micropropagação, as fases de multiplicação e enraizamento são de fundamental importância, uma vez que são indispensáveis para a obtenção das novas plantas. O controle dessas fases é dependente de vários fatores, como características intrínsecas da espécie, disponibilidade de luz, meio nutritivo utilizado e balanço hormonal, dentre os quais o último é um dos fatores mais relevantes para o sucesso dessa técnica. De acordo com SCHUCH & 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*.

Na fase de enraizamento, uma das maneiras de favorecer o adequado balanço hormonal é a aplicação exógena de auxinas, tais como o AIB, que elevam seu teor nos tecidos. Embora o ácido indolacético (AIA) seja considerado a principal auxina envolvida no processo de enraizamento, o AIB é o mais utilizado, pelo fato de essa auxina não causar fitotoxicidade aos explantes em uma larga faixa de concentração (IACONA & MULEO, 2010).

O tipo de citocinina e a sua concentração são fatores que influenciam no sucesso da multiplicação *in vitro* (SCHUCH & ERIG, 2005). A utilização desta tem revelado eficiência no processo de multiplicação tanto de estruturas aéreas como na indução de gemas adventícias em diversas espécies (LEITZKE et al., 2009).

A fonte de luz utilizada na cultura de tecidos vegetais é muito importante na multiplicação e enraizamento *in vitro*. Geralmente, a fonte de luz utilizada na sala de crescimento é a lâmpada fluorescente branca-fria. Entretanto, alguns estudos têm demonstrado que a qualidade da luz influencia na multiplicação e enraizamento (IACONA & MULEO, 2010) de explantes *in vitro*. Segundo ERIG & SCHUCH (2005), a qualidade da luz afeta a eficiência biológica dos fitorreguladores adicionados ao meio de cultura, bem como o balanço hormonal nos tecidos. Consequentemente, a qualidade da luz surge como uma ferramenta na manipulação da indução de balanços fisiológicos favoráveis a respostas específicas no crescimento das plantas.

Logo, o objetivo deste trabalho foi verificar a influência dos fitorreguladores BAP e AIB, aliados à

qualidade de luz, na multiplicação e enraizamento *in vitro*, respectivamente, da amoreira-preta, cultivar 'Xavante'.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Micropropagação de Plantas Frutíferas, do Departamento de Fitotecnia da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel (FAEM), da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), no ano de 2011, em Pelotas, RS (31° 48' 11" S; 52° 24' 53" W). O trabalho foi dividido em dois experimentos: multiplicação e enraizamento.

O material experimental, oriundo do cultivo *in vitro* da amoreira-preta 'Xavante', constituiu-se de segmentos nodais caulinares, com duas gemas e duas folhas apicais para o experimento de enraizamento e segmentos nodais padronizados com 2 a 3 gemas para o de multiplicação. Para ambos os experimentos, o delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, constituindo fatorial (4x2), com quatro níveis para o fator qualidade de luz e dois níveis para fitorregulador. Os níveis do primeiro fator, para ambos os experimentos, foram: luz azul, vermelha, branca e ausência de luz (escuro). As duas primeiras foram obtidas por meio da modificação do espectro luminoso das lâmpadas fluorescentes brancas frias, utilizando filtros coloridos de acetato celulose, do tipo *Lee Filters*, com as seguintes especificações: azul (número 118 *Light blue*), vermelho (número 106 *Primaryred*), luz branca das lâmpadas fluorescentes e ausência de luz pelo acondicionamento dos frascos em caixas de papel. Os níveis do segundo fator foram presença e ausência de fitorregulador, utilizando-se para isto 0,5mg L⁻¹ de AIB, como fonte de auxina no experimento de enraizamento e 0,8mg L⁻¹ de BAP como fonte de citocinina no experimento de multiplicação. As concentrações desses fitorreguladores foram definidas com base em experimentos preliminares. Foram utilizadas cinco repetições por tratamento, sendo cada uma destas constituída de um frasco com cinco explantes.

O meio de cultura utilizado foi o MS, com 100mg L⁻¹ de mioinositol, 30g L⁻¹ de sacarose. O pH foi ajustado para 5,8 antes da inclusão do ágar na concentração de 6g L⁻¹ e, posteriormente, autoclavado a 121°C e 1,5atm, por 20 minutos. Foram utilizados frascos de 250mL com 30mL de meio de cultura. Posteriormente, foi realizada a inoculação dos explantes no meio de cultura, em câmara de fluxo laminar para evitar contaminação. Em seguida, estes foram transferidos para sala de crescimento com temperatura de 25±2°C, fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo de fótons de 27μmol m⁻²s⁻¹.

As variáveis analisadas no experimento de enraizamento foram: porcentagem de sobrevivência, número médio de raízes e comprimento da maior raiz (cm); e para o experimento multiplicação: número de folhas, número de gemas, número de brotações e comprimento das brotações (cm). As avaliações foram realizadas 60 dias após a entrada do material na sala de crescimento.

Para a análise dos dados, realizou-se a análise de variância aplicando o teste F e, quando este foi significativo, realizou-se a comparação pareada das médias pelo teste de Tukey com probabilidade de erro de 5%. As variáveis discretas, provenientes de contagem, foram transformadas através da expressão $(x+1)^{1/2}$ e dados expressos em porcentagem pela expressão $\arccos(x)^{1/2}$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Considerando o experimento de multiplicação, para todas variáveis, houve interação entre os fatores qualidade de luz e fitorregulador (Tabela 1). O número de brotações, de gemas e de folhas, para todos os níveis de qualidade de luz, com exceção do número de folhas no escuro, foram superiores na presença de BAP no meio de cultivo. VILLA et al. (2006), ao trabalharem com multiplicação in vitro de amoreira-preta 'Brazos', obtiveram melhores respostas para número de brotações com aplicação de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP ao meio de cultura. De acordo com MULEO & MORINI (2006), o aumento do nível de citocininas nos tecidos promove o crescimento de gemas laterais, reprimindo o efeito inibitório das auxinas, de acordo com a hipótese de que a dominância apical é regulada pela razão auxina/citocinina.

Considerando-se o fator qualidade de luz, na presença de BAP, os maiores valores para a variável número de brotações foram obtidos no escuro (2,36) e

luz branca (2,08). Na ausência de BAP, não houve diferenças entre os tratamentos (Tabela 1). Resultados distintos foram obtidos por MULEO & MORINI (2006) em experimento com o genótipo de macieira MM106, no qual o maior número de brotações foi observado quando os explantes foram submetidos à luz branca (47,9) e menor no escuro (23,3). ERIG & SCHUCH (2005) observaram que a luz branca induziu menor número de brotações (2,63) na framboeseira 'Batum'. Essas divergências entre os resultados provavelmente indiquem a existência de respostas diferenciadas entre espécies e até mesmo entre cultivares com relação à absorção de luz.

O número de gemas, na presença de BAP, foi maior com as luzes branca (28,12), azul (24,72) e vermelha (23,32), enquanto que na ausência não houve diferenças. O número de folhas, tanto na presença quanto na ausência de BAP, foi nulo (0) para o nível escuro e estatisticamente indiferente para os demais (Tabela 1). Em experimento semelhante com maçã 'Galaxy' e 'Mastergala', ERIG & SCHUCH (2006) constataram que, independentemente da luz utilizada, os melhores resultados foram obtidos utilizando BAP no meio de cultura comparado com meio sem BAP, indicando que esta substância é indispensável na superação da dominância apical e aumento na taxa de multiplicação dos brotos.

Quanto ao comprimento das brotações, na presença de BAP, os explantes submetidos ao escuro e luz azul foram superiores aos demais, enquanto que, na ausência deste fitorregulador, destacaram-se a condição de escuro e a luz vermelha. Para o fator fitorregulador, o maior comprimento das brotações foi observado na ausência de BAP, com a luz vermelha e escuro (Tabela 1). Os resultados obtidos com o nível escuro para essa variável podem ser explicados pela

Tabela 1 - Número de brotações, gemas e folhas e comprimento de brotações da amoreira-preta 'Xavante' em função da qualidade de luz e presença (C, $0,8 \text{ mg L}^{-1}$) e ausência (S, 0 mg L^{-1}) de 6-benzilaminopurina (BAP).

Qual. luz	----Número de brotações----		----Número de gemas----		-----Número de folhas-----		----Comprimento das brotações (cm)----	
	C/ BAP	S/ BAP	C/ BAP	S/ BAP	C/ BAP	S/ BAP	C/ BAP	S/ BAP
Branca	2,1 abA	1,3 aB	28,1 aA	6,0 aB	30,3 aA	6,3 aB	1,3 bA	0,8 bA
Verm.	1,7 bA	1,1 aB	23,3 aA	8,0 aB	23,8 aA	8,0 aB	1,6 bB	2,8 aBA
Azul	1,6 bA	1,1 aB	24,7 aA	7,4 aB	24,7 aA	7,1 aB	1,8 abA	2,3 bA
Escuro	2,4 aA	1,1 aB	7,7 bA	3,6 aB	0 bA	0 bA	2,7 aB	3,7 aA
CV(%)	7,6		14,4		15,9		30,2	

*Médias seguidas de mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade de erro. Qual: qualidade; Verm: vermelha.

tendência natural dos explantes em tentar alcançar a luz (estiolamento), favorecendo o crescimento vertical, em detrimento ao número de brotações, gemas e folhas.

No experimento de enraizamento, para a variável número médio de raízes, verificou-se interação entre os fatores. Na ausência de AIB no meio de cultura, a luz azul propiciou um maior número médio de raízes (2,06), sendo o menor valor observado quando as plantas foram mantidas no escuro (1,07). Por outro lado, na presença de AIB, não houve diferenças entre os níveis de qualidade de luz (Tabela 2). Resultados semelhantes também foram encontrados por IACONA & MULEO (2010), para os quais maior número de raízes em plantas micropropagadas do porta-enxerto de cerejeira cv. Colt foi observado quando se utilizou filtro de luz azul (11) em relação à vermelha (9). Esses resultados diferem de ROCHA et al. (2007), que não observaram diferenças no número de raízes formadas do porta-enxerto de *Prunus* Mr. S. 2/5, em função de diferentes qualidades de luz.

Analisando-se cada nível de qualidade de luz, em relação à ausência ou presença de AIB no meio de cultura, observou-se que, na presença deste fitorregulador, as luzes vermelha, azul e escuro propiciaram maior número de raízes (2,85; 3,08 e 3,08, respectivamente) (Tabela 2). Isso pode ser explicado pela capacidade das auxinas em induzir crescimento celular e também promover a divisão celular em cultura de tecidos. Assim, é possível constatar que existe relação positiva entre presença de fitorregulador e qualidade da luz. Esses resultados podem ser úteis para a micropropagação da amoreira-preta 'Xavante', pois, com maior número de raízes, aumenta-se o potencial de

absorção de água e nutrientes e, conseqüentemente, a taxa de sobrevivência após o transplante.

A porcentagem de sobrevivência não diferenciou nos fatores qualidade de luz e fitorregulador (Tabela 3). O fato de a presença de AIB não ter diferenciado da ausência pode ser devido ao fato da cv. Xavante apresentar quantidade de auxina endógena suficiente para estimular o enraizamento, não respondendo à adição exógena. Além disso, no cultivo *in vitro*, a água e nutrientes estão prontamente disponíveis aos explantes e, dessa forma, podem anular o efeito positivo do maior número de raízes observado na presença de AIB.

Para a variável comprimento da maior raiz, dentro do fator qualidade de luz, o nível de luz branca proporcionou maior comprimento de raízes (1,69cm), sendo superior apenas a luz azul (1,05cm). Para a mesma variável, mas analisando-se o fator fitorregulador, verificou-se que a ausência de AIB no meio de cultura proporcionou maior comprimento de raiz (1,83cm), sendo o menor quando se utilizou AIB (0,86cm) (Tabela 3). Uma hipótese para esse resultado é que o maior número de raízes das plantas no meio de cultivo com AIB possa ter induzido a maior competição pela auxina fornecida, tanto endógena quanto exógena (AIB) e, pelas reservas dos explantes, resultando em menor comprimento das raízes formadas. Esse resultado concorda com LEITZKE et al. (2009), os quais observaram redução no comprimento médio das raízes, com o aumento da concentração de AIB. No entanto, esse resultado é dependente da dose de auxina utilizada. De acordo com RADMANN et al. (2002), as auxinas, quando utilizadas em baixas concentrações, estimulam o alongamento das raízes, ocorrendo o efeito inverso quando em altas concentrações. Segundo esse mesmo autor, tal efeito ocorre porque as auxinas estimulam a produção de etileno.

CONCLUSÃO

A utilização de BAP no meio de cultivo, na dose de 0,8mg L⁻¹, aumenta o número de brotações, gemas e folhas da amoreira-preta 'Xavante' e, dessa forma, é indicada para sua multiplicação *in vitro*. A adição de AIB (0,5mg L⁻¹) no meio de cultura induz maior número de raízes na regeneração de explantes de amoreira-preta 'Xavante', quando combinada com o espectro luminoso azul e vermelho. No entanto, essa cultivar apresenta adequado enraizamento *in vitro* na ausência de AIB.

Tabela 2 - Número médio de raízes da amoreira-preta 'Xavante' em função da qualidade de luz e da presença (C, 0,5mg L⁻¹) ou ausência (S, 0mg L⁻¹) de ácido indolbutírico (AIB).

Qualidade de luz	-----Número médio de raízes-----	
	S/AIB	C/AIB
Branca	2,0 ab A*	2,2 a A
Vermelha	1,6 ab B	2,9 a A
Azul	2,1 a B	3,1 a A
Escuro	1,1 b B	3,1 a A
CV (%)	10,2	

*Médias seguidas de mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo Teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade de erro.

Tabela 3 - Porcentagem de sobrevivência e comprimento da maior raiz da amoreira-preta 'Xavante' em função da qualidade de luz e da presença (C, 0,5mg L⁻¹) ou ausência (S, 0mg L⁻¹) de ácido indolbutírico (AIB).

Tratamentos		Porcentagem de sobrevivência (%)	Comprimento da maior raiz (cm)
Qualidade de Luz	Branca	78,0 ^{ns}	1,7 a*
	Vermelha	87,5	1,5 ab
	Azul	94,6	1,1 b
	Escuro	78	1,2 ab
Auxina	S/AIB	83,5 ^{ns}	1,8 a
	C/AIB	85,5	0,9 b
CV (%)		21,3	30,5

*Médias seguidas de mesma letra, minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade de erro. ns: não significativo.

REFERÊNCIAS

CAMPAGNOLO, M.A.; PIO, R. Enraizamento de estacas caulinares e radiculares de cultivares de amoreira-preta coletadas em diferentes épocas, armazenadas a frio e tratadas com AIB. **Ciência Rural**, v.42, n.2, p.232-237, 2012a. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010384782012000200008&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 30 set. 2011. doi: 10.1590/S0103-84782012000200008.

CAMPAGNOLO, M.A.; PIO, R. Produção da amoreira-preta 'Tupy' sob diferentes épocas de poda. **Ciência Rural**, v.42, n.2, p.225-231, 2012b. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010384782012000200007&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 28 set. 2011. doi: 10.1590/S0103-84782012000500007.

CHEN, W.L.; YEH, D.M. Elimination of *in vitro* contamination, shoot multiplication, and *ex vitro* rooting of *Aglaonema*. **HortScience**, v.42, p.629-632, 2007.

ERIG, A.C.; SCHUCH, M.W. Ação da 6-Benzilaminopurina e da qualidade da luz na multiplicação *in vitro* de macieira (*Malus domestica* Borkh.) cvs. Galaxy e Mastergala. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.12, n.2, p.151-155, 2006. Disponível em: <<http://www.ufpel.tche.br/faem/agrociencia/v12n2/artigo05.pdf>>. Acesso em: 12 set. 2011.

ERIG, A.C.; SCHUCH, M.W. Tipo de luz na multiplicação *in vitro* de framboeseira (*Rubus idaeus* L.) 'Batum'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.27, p.488-490, 2005. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010029452005000300035&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 29 set. 2011. doi: 10.1590/S0100-29452005000300034.

IACONA, C.; MULEO, R. Light quality affects *in vitro* adventitious rooting and *ex vitro* performance of cherry rootstock colt. **Scientia Horticulturae**, v.125, p.630-636, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030442381000244X>>. Acesso em: 28 set. 2011. doi:10.1016/j.scienta.2010.05.018.

LEITZKE, L.N. et al. Meio de cultura, concentração de AIB e tempo de cultivo no enraizamento *in vitro* de amora-preta e framboeseira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.31, n.2, p.582-587, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010029452009000200037&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 26 set. 2011. doi: 10.1590/S0100-2945200900020003.

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. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S141370542009000700045&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 27 set. 2011. doi: 10.1590/S1413-70542009000700045.

MULEO, R.; MORINI, S. Light quality regulates shoot cluster growth and development of MM106 apple genotype *in vitro* culture. **Scientia Horticulturae**, v.108, p.364-370, 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304423806000999>>. Acesso em: 28 set. 2011. doi:10.1016/j.scienta.2006.02.014.

RASEIRA, M.C.B. et al. Classificação botânica, origem e cultivares. In: ANTUNES, L.E.C.; RASEIRA, M. do C.B. **Aspectos técnicos da cultura da amora-preta**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2004. p.17-28. (Documentos, 122).

RADMANN, E.B. et al. Efeito de auxinas e condições de cultivo no enraizamento *in vitro* de porta-enxertos de macieira 'M-9'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.24, p.624-628, 2002. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010029452002000300011&lang=pt>. Acesso em: 23 set. 2011. doi: 10.1590/S0100-29452002000300011.

ROCHA, P.S.G. et al. Qualidade da luz na micropropagação do porta-enxerto de 'Prunus' cv. Mr. 2/5. **Bioscience journal**, v.23, p.32-40, 2007.

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, 2005. p.155-173.

VILLA, F. et al. Propagação de amora-pretautilizando estacas lenhosas. **Ciência e Agrotecnologia**, v.27, p.829-834, 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S141370542003000400013&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 10 set. 2011. doi: 10.1590/S1413-70542003000400012.

VILLA, F. et al. Multiplicação *in vitro* de amoreira-preta cultivar Brazos. **Ciência e Agrotecnologia**, v.30, n.2, p.266-270, 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-70542006000200011&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 03 jan. 2012. doi: 10.1590/S1413-70542006000200011.