

EFEITO DO MUTAGÊNICO METILMETANOSULFONATO EM *PHYSALIS*

Marcio dos Santos¹
Murielli Sabrina Gemeli³
Paulo Henrique Cerutti¹
Rita Carolina de Melo³
Cleiton Luiz Wille²
Cristiane Rosa Adams¹

RESUMO: No Brasil existe uma grande demanda por frutos de *Physalis peruviana* e mesmo frente ao seu potencial econômico, não ha cultivares melhoradas, o que impede a expansão da cultura. O principal entrave para o melhoramento genético está relacionado com a base genética restrita que a espécie apresenta. Deste forma, a indução mutacional com agente químico pode ser uma importante ferramenta para o incremento na variabilidade genética. Por isso, o presente trabalho teve por objetivo avaliar o efeito da exposição de sementes de *physalis* em diferentes doses de metilmetanosulfonato (MMS) aliado a pré-embebição em água. Para isso, as sementes foram submetidas aos tratamentos de embebição (com e sem) e expostas a uma solução líquida do agente mutagênico por 2 horas, utilizando-se as doses de 0, 0.75, 1.5, 3, e 6% v/v do produto ativo. A semeadura foi realizada em bandejas de isopor contendo substrato comercial Mac plant[®], e mantidas em casa de vegetação. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 4, com 3 repetições. Avaliou-se a porcentagem total de germinação, número de plântulas anormais, número de folhas por plântulas, comprimento de raiz, estatura de plântulas e a sobrevivência. Os resultados demonstraram que a embebição em água potencializa os efeitos do mutagênico, resultando em mudanças significativas para o comprimento de raiz e estatura de plântulas. Em relação às doses avaliadas, todas as variáveis apresentaram comportamento diferenciando quando comparados com o grupo controle, exceto para o número de folhas por plântulas. Considerando que o aumento da dose resulta em maior frequência de mutações, mas reduz a sobrevivência das plântulas, pode-se inferir que uma faixa entre 3,3 a 4,8 % de MMS, pode ser utilizada para a indução de mutações para a espécie sem prejuízo para a sobrevivência das plântulas.

Palavras-chave: Mutação, Variabilidade genética, Melhoramento vegetal.

1 Mestrando (a) do Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal, Universidade do Estado de Santa Catarina.
2 Graduando em Agronomia pela Universidade do Estado de Santa Catarina.
3 Doutorando (a) do Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal, Universidade do Estado de Santa Catarina.

EFFECT OF METHYLMETHANESULFONATE MUTAGENIC IN PHYSALIS

ABSTRACT: Brazil presents great demand for fruits of *Physalis peruviana* and even though this crop has been showing its economic potential, there are no improved cultivars, which prevents its expansion. The main obstacle to genetic improvement is related to the restricted genetic base that this species presents. In this way, mutational induction with a chemical agent can be an important tool for the increase of genetic variability. Therefore, the present study aimed at evaluating the effect of the exposure of physalis seeds in different doses of methyl methanesulfonate (MMS) and pre-imbibition in water. Initially, the seeds were submitted to the imbibition treatments (pre-imbibition and no pre-imbibition) and exposed to a liquid solution of the mutagenic agent for 2 hours, at the doses of 0, 0.75, 1.5, 3, and 6% v / v. Seeding was carried out in styrofoam trays containing commercial Mac plant © substrate and kept in a greenhouse. The experimental design was completely randomized in a 2 x 4 factorial scheme, with 3 replicates. The total percentage of germination, number of abnormal seedlings, number of leaves per seedlings, root length, height of seedlings and survival were evaluated. The results showed that the imbibition in water potentiates the effects of the mutagen, resulting in significant changes in root length and height of seedlings. When considering the evaluated doses, all the variables presented different results compared to the control group, except for the number of leaves per seedlings. Considering that increasing doses result in higher frequency of mutations but reduces the survival of the seedlings, we can infer that a range between 3.3 and 4.8% of MMS can be used to induce mutations for the species without prejudice to the survival of the seedlings.

Keywords: Mutation, Genetic variability, Plant breeding.

INTRODUÇÃO

A physalis (*Physalis peruviana*) é uma frutífera de origem Andina pertencente à família das solanáceas, muito apreciada devido aos seus frutos que apresentam características singulares de aroma e sabor. O fruto é uma baga, de forma arredondada e polpa suculenta, com diâmetro médio entre 1,25 a 2,65 cm e peso de 4 a 12 g (FISHER et al., 2014). Uma das características mais marcantes da physalis é a presença de um cálice ou capulho que envolve o fruto, com função de proteção contra insetos, doenças e na prolongação da vida de pós-colheita (MUNIZ, 2014).

Na Colômbia esta cultura possui uma grande importância econômica, com uma área plantada de 1500 ha e produção média estimada em 15 t. ha⁻¹ (AGRONET, 2018). Já no Brasil seu cultivo ainda é inicial e com produtividade baixa, em torno de 2 t. ha⁻¹ (TREVISANI, 2016; CEPA, 2015).

A baixa produção brasileira esta relacionada ao manejo inadequado e a

inexistência de cultivares de *physalis* melhoradas já registradas (MAPA, 2018; TREVISANI et al., 2016). A falta de cultivares registradas também inviabiliza que o produtor tenha acesso ao crédito rural, e causa redução ainda mais acentuada da competitividade do produto brasileiro, impedindo a expansão da cultura ou mesmo a sua autossuficiência.

Por isso, a implantação de um programa de melhoramento é de fundamental importância. Entretanto, de acordo com Trevisani et al. (2016), não existe variabilidade genética nas populações de *physalis* cultivadas no Sul do Brasil para as características de interesse agrônomo e sem recursos genéticos, esse processo se torna inviável. Aliado a isto, os eventos naturais de criação e ampliação de variabilidade genética são lentos, nem sempre benéficos e ainda difíceis de serem identificados (GRIFFTHS et al., 2015). Desta forma, a indução de mutação pode ser de fundamental importância para ampliar a base genética em populações de *physalis* (TREVISANI et al., 2018).

Existem diversos métodos para indução de mutação, dentre eles destacam-se o uso de agentes químicos. Isso ocorre por que são de baixo custo, encontrados no mercado facilmente, e com eficácia comprovada (FAO, 2018; JAIN, 2002; TULMANN NETO et al., 1998). Além disso, uma das grandes vantagens da indução de mutações por agentes químicos é de proporcionar juntamente com a seleção dirigida à alteração de um ou poucos caracteres agrônomicas de uma variedade, sem mudar o restante do genótipo.

Entre os mutagênicos químicos que podem ser utilizados para indução de mutação, se destaca o metilmetanosulfonato (MMS). Este agente atua sobre as bases nitrogenadas, resultando no processo adição ou substituição de radicais do grupo alquil (VONARX et al., 1998). Quando em contato com o material genético ocorre à metilação do oxigênio ligado ao carbono 6, o resultado da reação é o 7-metilguanina, pode também haver a formação de 3-adenina ou 3-guanina as quais possuem alta frequência de pareamento incorreto com as demais bases nitrogenadas, ou bloqueio da replicação celular, podendo resultar em alterações permanentes no DNA (ZAHA et al., 2014; RAMALHO et al., 2012).

A determinação do dano genômico em plantas pode ser avaliado indiretamente a partir de efeitos fisiológicos, como por exemplo: germinação de sementes, forma e números de folhas e estatura de plantas. No entanto, as plantas respondem de forma diferenciada quando expostas aos agentes mutagênicos, dependendo principalmente

do número de cromossomos, do conteúdo e ou ciclo celular e das características do material vegetal, como teor de água (SILVA et al., 2013; MIRANDA et al., 2009; COIMBRA et al., 2007; AHLOOWALIA, 2001).

Diante do que foi exposto, é necessário determinar a efetividade desse agente mutagênico na geração de variabilidade em *physalis*, bem como sua capacidade de alterar características de interesse agrônomo. Por isso, o presente trabalho teve por objetivo avaliar os efeitos da exposição de sementes de *physalis* em diferentes doses de metilmetanosulfonato com ou sem pré-embebição em água.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado em casa de vegetação da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), localizada em Lages-SC (27 ° 48' S, 50 ° 19' W, com altitude média de 920 m). O clima é o Cfb (clima temperado com verão fresco) e temperatura média anual de 15 ° C, com precipitação média de 1.500 mm), nos meses de janeiro a abril de 2018.

As sementes de *physalis* foram obtidas de frutos com maturação fisiológica adequada, proveniente de mercados locais do município de Lages-SC. Para a assepsia foi utilizado uma solução de hipoclorito de sódio a 0,5%, colocadas para secar a sombra, e acondicionadas em sacos de tule para compor os tratamentos. A determinação do tempo de pré-embebição em água, foi realizado um ensaio preliminar, no qual foi utilizado 10 h de imersão.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x4, sendo 2 níveis de pré-embebição em água (com e sem), antes da exposição a uma solução líquida do mutagênico e 4 níveis de doses (0%; 1,5 %; 3 % e 6 % v/v) do agente mutagênico metilmetanosulfonato (MMS), com três repetições. Cada unidade experimental constou de 32 sementes, totalizando 768 sementes.

Após a exposição ao agente mutagênico, as sementes foram colocadas em água corrente por uma hora e em baixo fluxo pelo mesmo período. Em seguida semeadas em bandeja de isopor de 124 células, contendo substrato comercial Mac Plant[®].

As variáveis avaliadas após 30 dias da semeadura foram: a porcentagem total de germinação (%), número de plântulas anormais (%), número de folhas por plântula

(Un), estatura de plântula (cm), comprimento de raiz (cm) e sobrevivência (%). Foram consideradas germinadas as sementes que apresentavam protrusão da radícula.

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), pelos modelos lineares gerais (procedimento GLM). Para as variáveis que apresentaram interação entre os fatores, foram realizados os efeitos simples pelo desdobramento. Foi verificado o melhor ajuste das regressões por meio de contrastes polinomiais, e por fim foram realizadas regressões lineares. As análises estatísticas foram realizadas pelo programa computacional SAS.

RESULTADOS

Através da análise de variância foram observadas diferenças significativas para o fator embebição nas variáveis estatura de plântulas e comprimento radicular. Enquanto que, não houve efeito para germinação de sementes, número de plântulas anormais, número de folhas e sobrevivência (Tabela 1).

Tabela 1. Valores médios para os principais danos fisiológicos causados pela embebição ou não de sementes em água nas plântulas de *Physalis peruviana* expostas ao mutágeno metilmetanosulfonato: germinação de sementes (GER), número de plântulas anormais (ANOR), comprimento radicular (CR), número de folhas (NDF) e sobrevivência de physalis.

Table 1. Mean values for the main physiological damages caused by water pre-imbibition or no pre-imbibition of seeds exposed to the mutant methylmethanesulfonate in Physalis peruviana seedlings: seed germination (GER), number of abnormal seedlings (ANOR), root length (CR), number of leaves (NDF) and survival of physalis

EMBEBIÇÃO EM ÁGUA	GER (%)	ANOR (%)	NDF (un)	CR (cm)	SOB (%)
Sementes não embebidas	67.67 ^{ns}	2.46 ^{ns}	3.92 ^{ns}	4.73 [*]	67.46 ^{ns}
Sementes embebidas	57.55	0.55	3.58	2.78	48.72
CV (%)	20.39	17.83	26.89	61.76	25.11

^{ns}: não significativo ou ^{*}: significativo segundo o teste F ($p \leq 0,05$). CV: coeficiente de variação.

Para a germinação de sementes, houve comportamento diferenciado apenas para a dose, sendo que a maior concentração utilizada reduziu a germinação de sementes em 90,6%, em relação à testemunha. Desta forma, como também não foi observado interação entre embebição e dose, foi ajustada apenas uma equação, no qual o modelo que apresentou o melhor ajuste e teve o maior coeficiente de determinação (R^2 : 0.90) foi ao quadrático (Figura 1).

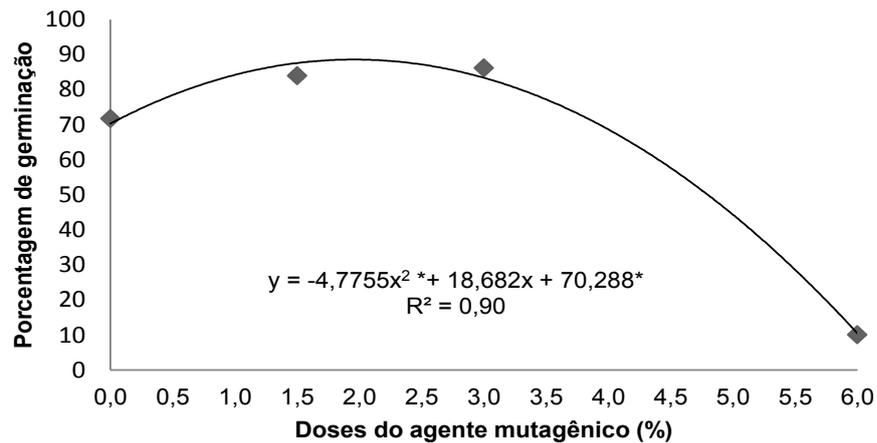


Figura 1 – Porcentagem de germinação de sementes em função da exposição de sementes de physalis em diferentes doses do mutagênico. *: significativo ($p \leq 0,05$) pelo teste F.

Figure 1 - Percentage of seed germination as a function of the exposure of physalis seeds at different doses of the mutagen. *: significant ($p \leq 0.05$) by the F test

A variável número de plântulas anormais não apresentou diferenças significativas para embebição e nem para as doses, assim como o número de folhas por plântulas (Tabela 1). Já para o comprimento de raiz foi observado efeito significativo para embebição e para e as diferentes concentrações aplicadas do mutagênico. Desta forma, foram ajustadas regressões lineares para sementes com embebição e sem embebição em água (Figura 2).

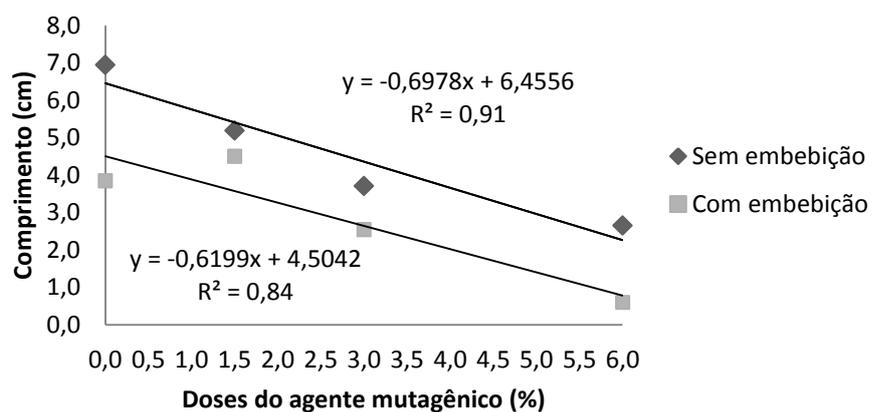


Figura 2 – Comprimento de raiz em função da exposição de sementes de physalis em diferentes doses do mutagênico. *: significativo ($p \leq 0,05$) pelo teste F.

Figure 2 - Root length as a function of the exposure of physalis seeds at different doses of the mutagen. *: significant ($p \leq 0.05$) by the F test.

O efeito da interação entre os fatores avaliados foi significativo para estatura de plântulas, dessa forma também foram ajustadas regressões para cada nível da embebição em função das doses de metilmetanosulfonato (Figura 3). No entanto, houve diferenças significativas para essa variável apenas para sementes pré-embebidas em água antes da aplicação do agente mutagênico, sendo que o modelo se ajustou ao polinômio linear (R^2 : 0,96).

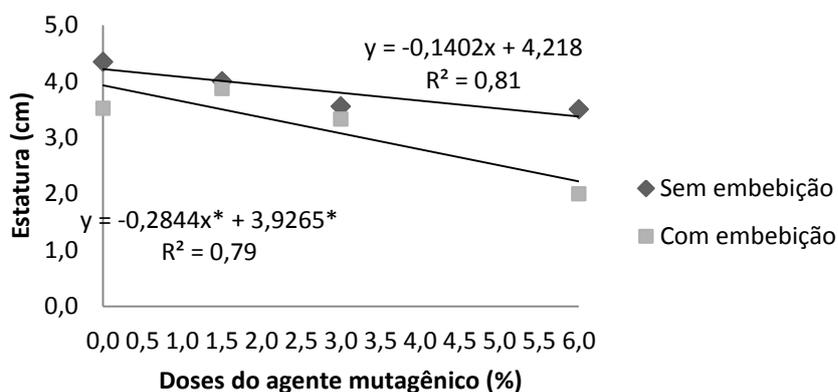


Figura 3 – Estatura de plântulas em função da exposição de sementes de physalis em diferentes doses do mutagênico. *: significativo ($p \leq 0,05$) pelo teste F.
 Figure 3 – Height of seedlings as a function of exposure of physalis seeds at different doses of the mutagen. *: significant ($p \leq 0,05$) by the F test.

Para a sobrevivência de plântulas foi observado comportamento diferenciado para as doses, a qual também análise apresentou ajuste linear (Figura 4).

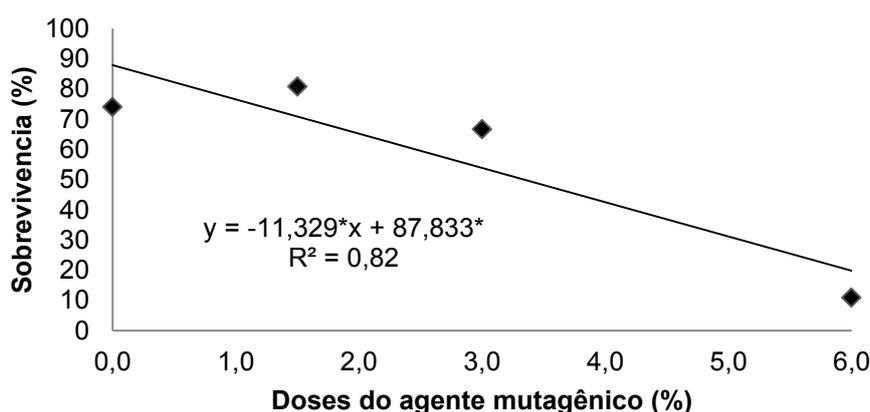


Figura 4 – Sobrevivência de plântulas em função da exposição de sementes de physalis em diferentes doses do mutagênico. *: significativo ($p \leq 0,05$) pelo teste F.
 Figure 4 - Survival of seedlings as a function of exposure of physalis seeds at different doses of the mutagen. *: significant ($p \leq 0,05$) by the F test.

DISCUSÃO

A embebição em água teve efeito para as variáveis: estatura de plântulas e comprimento radicular. Acredita-se que quanto maior o teor de umidade na semente torna o material vegetal mais sensível, sendo que sementes embebidas antes da exposição aos tratamentos apresentaram melhores resultados à ação dos agentes mutagênicos que as sementes com baixo teor de umidade (VICCINI, 1999; MIRANDA, 2009). De acordo com Viccini et al. (1999) isso ocorre devido ao aumento da atividade metabólica e a formação de radicais livres nas células, ocasionando maiores danos à estrutura do DNA.

Pesquisas realizadas em arroz (*Oryza sativa* L.) corroboram com os resultados obtidos no presente trabalho. No qual os autores também encontraram maiores danos fisiológicos nas plântulas quando as sementes expostas ao mutagênico apresentaram maiores teores de água, para o caráter estatura (MIRANDA et al., 2009). Esses resultados indicam que sementes embebidas podem revelar maiores chances de obtenção de resultados satisfatórios, no que diz respeito ao incremento da variabilidade genética, para as necessidades do melhorista de *physalis*.

Os coeficientes de variação oscilaram de 17.83 a 61.76%. No entanto, apesar dos altos valores obtidos, a precisão dos resultados está dentro do esperado. De acordo com Gaul.(1997), isto ocorre porque a metodologia para a determinação dos efeitos dos agentes mutagênicos no tratamento de sementes são técnicas que inferem diretamente nos caracteres germinação de sementes e sobrevivência de plantas.

A sobrevivência média de plântulas foi de 42 %, sendo que esses resultados são similares aos encontrados por Gupta et al. (2018), no qual encontraram em ensaios com essa natureza, 60 a 80% de mortalidade entre as sementes germinadas.

Para número de plântulas anormais, apesar de não haver diferenças significativas, foram observados 2,46 % de mutantes na dose 3 % de metilmetanosulfonato para sementes embebidas em água, sendo que os principais danos fisiológicos foram: plântulas com cotilédones fundidos e sem meristema apical, tri-cotiledonar, com dois cotilédones fundidos e um normal, folhas albinas e planta com quimerismo unilateral. Esses valores são similares aos encontrados por Gupta et al., 2018, o qual obteve 2,65 % de plantas mutantes de *physalis* na primeira geração de

mutantes (M1), utilizando etilmetanosulfonato. No entanto, com maior tempo de exposição.

Para as diferentes concentrações do mutagênico aplicado, os resultados apontaram valores decrescentes para a maioria das variáveis avaliadas, com aumento da dose do mutagênico testada. A partir dos dados obtidos em relação às doses aplicadas foi possível estabelecer uma faixa entre 3,3 a 4,8 % de concentração de metilmetanosulfonato para indução de mutação. Esta faixa corresponde aquela que cause a maior incidência de danos fenótipos, sem causar a morte da planta ou também denomina de dose letal mediana ou DL50 (DE BARROS; ARTHUR, 2005).

Apesar dos resultados iniciais encontrados neste trabalho, a indução de mutação apresenta relevante uso em programas de melhoramento genético de plantas, visto que o incremento da variabilidade é de extrema importância para introdução de novos alelos nas populações.

Além disso, o uso da criação de variabilidade genética pode estar associado com o incremento de caracteres de interesse agrônomo, como por exemplo, o aumento da produtividade e na qualidade de frutos. Sendo assim, a utilização destas técnicas revela-se de grande importância, principalmente em espécies como *physalis* por ser pouco melhorada e com escassos estudos sobre o seu comportamento frente a indução de mutação.

CONCLUSÃO

O uso de sementes embebidas antes da exposição ao agente químico e de diferentes doses de metilmetanosulfonato proporcionam maiores danos fisiológicos nas plântulas de *physalis*. Desta forma, podem ser utilizadas doses de 3,3 a 4,8 % (DL50) para a indução de mutações sem causar prejuízo a sobrevivência e aumentando as chances de observar incremento da variabilidade genética para caracteres de importância agrônoma.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa e auxílio financeiro.

REFERÊNCIAS

AGRONET. Estadística Agrícola. Disponível em: <<http://www.agronet.gov.co/estadistica/Paginas/default.aspx>>. Acesso em: 25 ago de 2018.

AHLOOWALIA, B.S.; MALUSZINSKY, M. Induced mutations: a new paradigm in plant breeding. *Euphytica*, v.119, n.2, p.67-173, 2001.

AMORIM, E.P.; PESTANA, R.K.N.; SILVA, S.O.; TULMANN NETO, A. Caracterização agrônômica de mutantes de bananeira obtidos por meio da radiação gama. *Bragantia*, Campinas, v.71, n.1, p. 8-14, 2012.

CECCARELLI, S. Efficiency of plant breeding. *Crop Science*, Madison, v.55, p.87-97, 2015.

COIMBRA, J. L. M.; CARVALHO, F. I. F.; OLIVEIRA, A. C.de; GUIDOLIN, A. F. Criação de variabilidade genética no caráter estatura de planta em aveia: hibridação artificial x mutação induzida. *Revista Brasileira Agrociência*, v. 10, n. 3, p.273–280, 2004.

DE BARROS, A.; ARTHUR, V. Determinação experimental da dose de redução do crescimento (GR50) e da dose letal (LD50) de soja irradiada por raios gama. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v. 72, n. 2, p. 249–253, 2005.

EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA E EXTENSÃO RURAL DE SANTA CATARINA (EPAGRI/CEPA) - Fruticultura em números Safra 2014/15. Disponível em: http://docweb.epagri.sc.gov.br/website_cepae/Fruticultura/Doc_271_Fruticultura_em_Numeros_2014_15.pdf>Acesso em: 26 ago. 2010.

FISCHER, G.; ALMANZA-MERCHAN, P. J; MIRANDA, D. Importância y cultivo de la uchuva (*Physalis peruviana* L.). *Revista Brasileira de Fruticultura*. Jaboticabal, v. 36, n. 1, p. 01-15, Mar. 2014.

FISCHER, G.; ALMANZA-MERCHAN, P. J; MIRANDA, D. Importância y cultivo de la uchuva (*Physalis peruviana* L.). *Revista Brasileira de Fruticultura*. Jaboticabal, v. 36, n. 1, p. 01-15, Mar. 2014.

FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION (FAO/IAEA). Mutant variety search. Disponível em: <<http://mvgs.iaea.org/Search.aspx/>>. Acesso em: 8 ago. 2018.

GAUL, H. Mutations in plant breeding. *Radiation Botany*, Great Britain, v. 4, p.155-232, 1997.

GRIFFITHS, A.J.F. Introdução a Genética. 9 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2015.

GUPTA, A. K.; SINGH, S. P.; SINGH, M.; MARBOH, E. S. Mutagenic Effectiveness and Efficiency of Gamma Rays and EMS on Cape Gooseberry (*Physalis peruviana* L.) International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, v. 7, n. 2, p. 3254-3260, 2018.

JAIN, S.M. A review of induction of mutations in fruits of tropical and subtropical regions. Acta Horticulturae, Wageningen, v.575, p.295-302, 2002.

LIMA, C. S. M.; MANICA-BERTO, R.; SILVA, S. J. P.; BETEMPS, D. L.; RUFATO, A. R. Principais coeficientes técnicos e insumos envolvidos na implantação de physalis na região sul (RS). Revista Ceres, Viçosa, v. 56, n. 5, p. 555-561, 2009.

LONDOÑO, J. (Ed.). *Physalis peruviana: fruta andina para el mundo: cultivo, recurso genético, agroindustria, normativa y mercado*. Madrid: Editorial Académica Española, 2013.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E PECUARIA (MAPA). Serviço Nacional de Proteção de Cultivares – SNPC. 2018. Disponível em: http://extranet.agricultura.gov.br/php/snpc/cultivarweb/cultivares_protegidas.php. Acesso: 26 jun. 2018.

MIRANDA, H. L. C.; BOBROWSKI, V. L.; TILLMANN, M. A. A.; DODE, L. B.; MENEGHELLO, G. E. Qualidade fisiológica de sementes de arroz submetidas à radiação gama. Ciência Rural, p. 1320–1326, 2009.

MUNIZ, J.; KRETZSCHMAR, A. A.; RUFATO, L. P.; TÂNIA REGINA, RUFATO, A. D R.; MACEDO, T. A.D. General aspects of physalis cultivation. Ciência Rural, Santa Maria, v. 44, n. 6, p. 964-970, Jun. 2014.

TREVISANI, N.; DE MELO, R. C.; BERNARDY, J. P. F.; PIERRE, P. M. O.; COIMBRA, J. L. M.; GUIDOLIN, A. F. Mutation induction as a strategy to overcome the restricted genetic base in *Physalis*. Revista Brasileira de Fruticultura. Jaboticabal, v. 40, n. 3, 2018.

TREVISANI, N. *Fisális (Physalis peruviana L.)*. Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal, v. 38, n. 2, 2016.

TULMANN NETO, A.; MENDES, B.M.J. Progressos na indução e uso de mutações in vitro. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (ed.). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa-SPI, p.459-506, 1998.

VONARX, E.J.; MITCHELL, H.L.; KARTHIKEYAN, R.; CHATTERJEE, I.; KUNZ, B.A. DNA repair in higher plants. Mutation Research. v. 400, p.187-200, 1999.

VICCINI, L. F., SARAIVA, L. S.; CRUZ, C. D. Resposta de sementes de milho à radiação gama em função do teor de água. Bragantia, Campinas, v.56, n.1, p.1-7, 1997

RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B.; PINTO, C. A. B. P. Genética na agropecuária. Lavras, UFLA, 2012.

SILVA, S. O.; AMORIM, E. P.; SANTOS-SEREJO, J. A.; FERREIRA, C. F.; RODRIGUEZ, M. A. D. Melhoramento genético da bananeira: estratégias e tecnologias disponíveis. Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal, v. 35, n. 3, p. 919-931, Set. 2013.

ZAHA, A.; FERREIRA, H. B.; PASSAGLIA, L. M. P. (Org.). Biologia molecular básica. 5. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2014.