

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

FACULDADE DE AGRONOMIA ELISEU MACIEL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA



Tese

**Criopreservação de cultivares de amoreira-preta**

**Andrio Spiller Copatti**

Pelotas, agosto de 2021

**Andrio Spiller Copatti**

Engenheiro Agrônomo

Doutor em Ciências

## **Criopreservação de cultivares de amoreira-preta**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, da Faculdade de Agronomia – Eliseu Maciel da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências, área do conhecimento: Fruticultura de Clima Temperado.

Orientador: Pesq. Prof. Dr. Luís Eduardo Corrêa Antunes

Coorientador: Pesq. Prof. Dr. Leonardo Ferreira Dutra

Prof. Dr. Valmor João Bianchi

Pelotas, agosto de 2021

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

C781c Copatti, Andrio Spiller

Criopreservação de cultivares de amoreira-preta /  
Andrio Spiller Copatti ; Luís Eduardo Corrêa Antunes,  
orientador ; Leonardo Ferreira Dutra, Valmor João  
Bianchi,  
coorientadores. — Pelotas, 2021.  
123 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em  
Agronomia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel,  
Universidade Federal de Pelotas, 2021.

1. *Rubus*. 2. Conservação de germoplasma. 3.  
Amorapreta.  
4. Encapsulamento-desidratação. 5. Vitrificação. I.  
Antunes, Luís Eduardo Corrêa, orient. II. Dutra, Leonardo  
Ferreira, coorient. III. Bianchi, Valmor João, coorient. IV.  
Título.

CDD : 634.38

## **Andrio Spiller Copatti**

### **Criopreservação de cultivares de amoreira-preta**

Tese aprovada como requisito parcial, para a obtenção do grau de Doutor em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, RS.

Data da defesa: 30 de agosto/ 2021.

#### **Banca Examinadora:**

---

Dr. Luís Eduardo Corrêa Antunes  
Pesquisador Embrapa Clima Temperado, Professor (Orientador).

---

Dr<sup>a</sup>. Maria do Carmo Bassols Raseira  
Pesquisadora Embrapa Clima Temperado

---

Dr. Paulo Celso de Mello-Farias  
Professor UFPel – PPGA

---

Dr. Alexandre Hoffmann  
Pesquisador Embrapa Clima Temperado

Suplentes:

---

Dr Flávio Gilberto Herter  
Professor UFPel – PPGA

---

Dr. Marcelo Barbosa Malgarim  
Professor UFPel – PPGA

A meu Pai, Ademir Antônio Copatti, que já não está mais entre nós, mas sei que lá de cima sua luz sempre iluminará minha vida;

À minha Mãe, que sempre me fez sorrir; me amparou; me deu amor e carinho; me viu cair; me viu levantar e me viu vencer, me inspirou a ter força, vontade, humildade;

À minha filha Cecília Victória Copatti, que através dos seus sorrisos, dos teus abraços me fortalece e motiva a cada dia.

**DEDICO...**

## Agradecimentos

A Deus, por guiar meus passos em todos os momentos de minha vida.

A meu pai Ademir Antônio Copatti (*in memoriam*), Engenheiro Agrônomo, exemplo de pessoa e profissional no qual me inspirei ao escolher a profissão.

À minha mãe Ivone Spiller Copatti e minha irmã Chaiane Elvira Spiller Copatti, que mesmo de longe sempre se fizeram presentes e apoiadoras e a minha filha Cecilia Victória, amo vocês.

Ao Pesquisador Dr. Luís Eduardo Corrêa Antunes, pela sua orientação, incentivo, e confiança em mim depositada.

Ao Professor Dr. Valmor João Bianchi, pela sua coorientação, disponibilidade e incentivo.

Ao Pesquisador Dr. Leonardo Ferreira Dutra, pela sua coorientação, disponibilidade e incentivo, pela cedência dos espaços, equipamentos e materiais do Laboratório de Cultura de Tecidos – LCT – Embrapa Clima Temperado que foram imprescindíveis para a confecção deste trabalho.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Centro de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado - CPACT. Pelotas - RS, em especial ao LCT, na pessoa da Analista Juliana Hey Coradin, pelo incentivo e apoio durante a confecção dos experimentos.

À Universidade Federal de Pelotas, pela oportunidade de realizar o Doutorado em Ciências (Fruticultura de Clima temperado).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Centro de Recursos Genéticos e Biotecnologia da Embrapa, na pessoa da pesquisadora Izulmé Rita Imaculada Santos, que nos recebeu em seu laboratório para treinamento em Técnicas de Criopreservação.

Aos demais professores da Fruticultura, pelos ensinamentos durante o curso de doutorado.

Aos amigos que durante esses anos de trabalhos dentro do LCT foram indispensáveis e se faziam presentes mesmo à distância.

Aos colegas e amigos da área de concentração em Fruticultura de Clima Temperado e demais colegas por toda a ajuda e momentos que passei junto a vocês.

A todos, aqui citados ou não, que contribuíram de alguma forma, direta ou indiretamente, para realização deste trabalho.

O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.

José Alencar

O insucesso é apenas uma oportunidade para recomeçar com mais inteligência.

Henry Ford

## Resumo

COPATTI, Andrio Spiller. **Criopreservação de cultivares de amoreira-preta. Tese** (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil, 2021

A amoreira-preta pertence ao gênero *Rubus* e à família Rosaceae e seus frutos são apreciados em todo o mundo. A propagação por estacas de raiz, rebentos ou hastes novas apresenta como desvantagens como a disseminação de pragas e doenças, além do alto custo de manutenção dos campos e da mão-de-obra. A Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, é detentora da maior coleção ex situ da cultura no Brasil. A conservação de genótipos, porém, para ser efetiva, passa atualmente pelo desenvolvimento de estratégias biotecnológicas que possam contornar problemas como doenças e danos ambientais, capazes de afetar materiais conservados por outros métodos. Nesse cenário, emerge a criopreservação que, além de proporcionar vantagens como eliminação de danos genéticos, diminuição da necessidade de avaliações periódicas e controle da viabilidade, proporciona a preservação de coleções por longos períodos com segurança, baixo custo de manutenção e utilizando pequenos espaços. Os criobancos auxiliam os programas de melhoramento genético e o setor produtivo na manutenção e disponibilização de genótipos. Protocolos de criopreservação para o gênero *Rubus* já são descritos em outros países; entretanto, a transferência de tecnologia ou a repetibilidade em laboratórios distintos é um desafio a ser enfrentado. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi estudar protocolos de criopreservação e aperfeiçoar técnicas de resfriamento para diferentes genótipos de amoreira-preta. Foram realizados ensaios testando e adequando metodologias de preparo e procedimentos para encapsulamento-desidratação e vitrificação de tecidos vegetais. Inicialmente, foram utilizados os mais novos lançamentos da Embrapa ('BRS Xingu' e 'BRS Caingá') e em um segundo momento adicionaram-se outros materiais ('Tupy' e 'Comanche'). A esses genótipos aplicaram-se testes preliminares de composição das cápsulas de alginato e do meio de regeneração, desidratação da matriz de alginato, exposição aos crioprotetores e pré-condicionamento; foram também realizados ensaios com as técnicas de encapsulamento-desidratação e vitrificação com aplicação de metodologias de resfriamento lento e ultrarrápido, totalizando onze ensaios aqui apresentados. Os experimentos foram conduzidos adotando-se o delineamento inteiramente ao acaso. Os dados foram submetidos à análise de variância através do teste F ( $p \leq 0,05$ ). Constatando-se significância estatística, os dados foram comparados por testes de probabilidade e regressões polinomiais conforme a necessidade. Os testes preliminares apresentaram bons resultados, obtendo-se até 95% de sobrevivência nos experimentos em que foram testados a composição da cápsula e o meio de regeneração; porém, a imersão em nitrogênio líquido ocasionou necrose na maior parte do material, obtendo-se 12% de sobrevivência dos explantes encapsulados. Nos ensaios com a técnica de vitrificação e com a aplicação de pré-condicionamento com variação térmica dia/noite e crioprotetor PVS2, quando os tratamentos foram realizados em baixa temperatura, bons resultados foram observados, com sobrevivência de 43, 55, 55 e 63% para as cultivares 'BRS Xingu', 'BRS Caingá', 'Tupy' e 'Comanche', respectivamente. Melhorias nos processos pré-criopreservação podem ser realizadas, como o tempo de desidratação do conjunto cápsula explante, a composição da cápsula e do meio de

regeneração nos trabalhos de encapsulamento-desidratação. As técnicas de vitrificação, por sua vez, apresentaram bons resultados de sobrevivência, porém com a formação de calos.

**Palavras-chave:** *Rubus*, conservação de germoplasma, amora-preta, encapsulamento-desidratação, vitrificação.

## Abstract

COPATTI, Andrio Spiller. Cryopreservation of blackberry cultivars. (Doctoral thesis) – Graduate Program in Agronomy. Federal University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil, 2021.

The blackberry belongs to the *Rubus* genus and the Rosaceae family and its fruits are appreciated all over the world. Propagation by root cuttings, shoots or new stalks has disadvantages of spreading pests and diseases, in addition to the high cost of maintaining the fields and of labor. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, holds the largest ex situ collection of this culture in Brazil. The conservation of genetic materials, however, to be effective, requires the development of biotechnological strategies that can overcome problems such as diseases and environmental damage capable of affecting materials preserved by other methods. In this scenario, cryopreservation emerges because, in addition to providing advantages such as the elimination of genetic damage, reducing the need for periodic assessments and control of viability, provides the preservation of collections for long periods with safety, low maintenance costs and using small spaces. Cryobanks help the genetic breeding programs and the productive sector in the maintenance and availability of genotypes. Cryopreservation protocols for the *Rubus* genus are already described in other countries; however, transfer of technology or repeatability in different laboratories is a challenge to be faced. Therefore, the objective of this work was to study cryopreservation protocols and improve freezing techniques for different blackberry genotypes. Tests were carried out, testing and adapting preparation methodologies and procedures for encapsulation-dehydration and vitrification of plant tissues. Initially, Embrapa's newest releases ('BRS Xingu' and 'BRS Caingua') were used, and in a second moment, other materials ('Tupy' and 'Comanche') were added. These genotypes were subjected to preliminary tests of composition of alginate capsules and regeneration medium, dehydration of the alginate matrix, exposure to cryoprotectants and preconditioning; tests were also carried out with encapsulation-dehydration and vitrification techniques with the application of slow and ultra-fast freezing methodologies, totaling eleven tests presented here. The experiments were conducted using a completely randomized design. Data were subjected to analysis of variance using the F test ( $p \leq 0.05$ ). Finding statistical significance, the data were compared by probability tests and polynomial regressions as needed. Preliminary tests showed good results, obtaining up to 95% survival in experiments in which the composition of the capsule and the regeneration medium were tested; however, immersion in liquid nitrogen caused necrosis in most of the material, resulting in 12% survival of the encapsulated explants. In the tests with the vitrification technique and with the application of preconditioning with day/night thermal variation and PVS2 cryoprotectant, when the treatments were carried out at low temperature, good results were observed, with survival of 45, 60, 56 and 63% cultivars 'BRS Xingu', 'BRS Caingua', 'Tupy' and 'Comanche', respectively. Improvements in pre-cryopreservation processes can be made, such as the dehydration time of the explant capsule set, the composition of the capsule and the regeneration medium in the encapsulation-dehydration work. The vitrification techniques, in turn, showed good survival results, but with calluses formation.

**Keywords:** *Rubus*, germplasm conservation, blackberry, encapsulation-dehydration, vitrification.

## Lista de tabelas

Tabela 1 Culturas de interesse agrônomo em que protocolos de criopreservação demonstraram eficiência na preservação e regeneração. COPATTI, (2021).....	28
Tabela 2 Soluções Osmoprotetoras mais comumente utilizadas: adaptado de (ROQUE-BORDA et al., 2021).....	31
Tabela 3 Composição das principais soluções de vitrificação: adaptado de (ROQUE-BORDA et al., 2021).....	32
Tabela 4 Regeneração, número de gemas, número de brotações e comprimento da maior brotação de explantes de amoreira-preta 'BRS XINGU', submetidas a diferentes formulações de cápsula de alginato de sódio, na presença ou ausência de fitorregulador BAP e/ou carvão ativado (EMBRAPA Clima Temperado, Pelotas, RS, Brasil, 2021).....	60
Tabela 5 Sobrevivência de explantes de amoreira-preta, 'BRS Xingu' e 'Tupy', submetidos à vitrificação utilizando RL e RU (EMBRAPA Clima Temperado, Pelotas, RS, Brasil, 2021).....	98
Tabela 6 Sobrevivência de explantes de amoreira-preta, 'Comanche', 'Tupy', 'BRS Xingu' e 'BRS Caingá', submetidos à vitrificação utilizando RL e RU, com ou sem solução PVS2 nos criotubos no momento da imersão em NL (EMBRAPA Clima Temperado, Pelotas, RS, Brasil, 2021).....	100

## Lista de figuras

- Figura 1 Esquema representativo dos métodos modernos de criopreservação (LS – Loading solution; PVS – Plant vitrification solution; NL – Nitrogênio líquido)..... 35
- Figura 2 A: cápsula em crioplaca de alumínio; B: dessecação de cápsulas sobre CaCl<sub>2</sub>; C: dessecação de cápsulas sobre sílica-gel..... 50
- Figura 3 Explantes de amoreira-preta ‘BRS Xingu’ recuperados de explantes envoltos em matriz de alginado de cálcio (A -T1 – Cápsula sem antioxidante; B -T2 – Cápsula + CA (0,5 g L<sup>-1</sup>); C -T3 - Cápsula + BAP (0,8 mg L<sup>-1</sup>); D -T4 – Cápsula + CA (0,5 g L<sup>-1</sup>) + BAP (0,8 mg L<sup>-1</sup>); após 30 dias de cultivo em sala de crescimento..... 61
- Figura 4 Avaliação da sobrevivência de explantes de amoreira-preta “BRS Xingu” encapsuladas em diferentes antioxidantes e submetidas a imersão em NL(A -T1 – Cápsula sem antioxidante; B -T2 – Cápsula + CA (1 g L<sup>-1</sup>); C -T3 - Cápsula + CA (1 g L<sup>-1</sup>) + PVP (1g L<sup>-1</sup>); D -T4 - Cápsula + CA (1 g L<sup>-1</sup>) + AA (0,5 g L<sup>-1</sup>); E -T5 - Cápsula + PVP (1 g L<sup>-1</sup>); F -T6 - Cápsula + PVP (1g L<sup>-1</sup>) + AA (0,5 g L<sup>-1</sup>); G -T7 - Cápsula + AA (0,5 g L<sup>-1</sup>); H -T8 - Cápsula + CA (1 g L<sup>-1</sup>) + PVP (1g L<sup>-1</sup>) + AA (0,5 g L<sup>-1</sup>))..... 64
- Figura 5 Regeneração (%), número de gemas, número de brotações e comprimento da maior brotação (cm) em plântulas de amoreira-preta “BRS Xingu”, encapsuladas em alginato de cálcio (4,5%), dispostas em meio de cultura MS acrescidos de concentrações de citocininas BAP ou 2iP (As barras verticais representam o intervalo de confiança a 95%). Figura 5 – Regeneração (%), número de gemas, número de brotações e comprimento da maior brotação (cm) em plântulas de amoreira-preta ‘BRS Xingu’, encapsuladas em alginato de cálcio (4,5%), dispostas em meio de cultura MS acrescidos de concentrações de citocininas BAP ou 2iP..... 65
- Figura 6 Regeneração (%), número de brotações, número de gemas e umidade relativa de gemas de amoreira-preta ‘BRS Xingu’ desidratada em sílica-gel ou cloreto de cálcio, ao longo do tempo. Embrapa Clima Temperado, 2020. (As barras verticais representam o intervalo de confiança a 95%)..... 68
- Figura 7 Sobrevivência (%), regeneração (%), número de gemas e número de brotações de amoreira-preta ‘BRS Cainguá’, ao longo do tempo de exposição à solução de vitrificação PVS2. Embrapa Clima Temperado, 2020. (As barras verticais representam o intervalo de confiança a 95%)..... 72
- Figura 8 Resultados obtidos a partir da criopreservação de explantes de amoreira-preta ‘BRS Xingu’ expostos a tratamentos osmoprotetores e resfriamento lento ou ultrarrápido: A -T1 – Controle (sem PVS e sem resfriamento); B -T2 – Sem PVS, resfriamento rápido (imersão em NL); 76

C -T3 – PVS2, sem resfriamento; D -T4 – PVS2, resfriamento rápido (imersão em NL); E -T5 – PVS2, resfriamento lento (1o C min-1), imersão em NL; F -T6 – PVS3, sem resfriamento; G -T7 – PVS3, NL; H -T8 – PVS3, resfriamento lento (1o C min-1), imersão em NL. Embrapa Clima Temperado, 2020.....

- Figura 9 – Explantes de amoreira-preta ‘BRS Caingá’ submetidas a condicionamento com sacarose e DMSO criopreservadas com ou sem solução PGD nos criotubos e aplicação da metodologia de resfriamento lento (A -T1 – Controle sem PGD, sem resfriamento; B -T2 – Controle com PGD, sem resfriamento; C -T3 – Sem PGD, resfriamento lento (-1 oC min-1 até -20 oC), imersão em NL; D -T4 – Com PGD, resfriamento lento (-1 oC min-1 até -20 oC), imersão em NL; E -T5 – Sem PGD, resfriamento rápido (imersão em NL); F -T6 – Com PGD, resfriamento rápido (imersão em NL))..... 94
- Figura 10 Vitriificação ‘BRS Xingu’, resultados obtidos no experimento 9 com a aplicação de técnicas de resfriamento lento e resfriamento rápido para a criopreservação (A -T1 – Controle (MS, sala de crescimento); B -T2 – Controle NL; (MS, sala de crescimento); C -T3 – LS (20 min); PVS2 (40 min); RS (20 min.); MS; escuro (7 dias); D -T4 – LS (20 min); PVS2 (40 min); NL (7 dias); RS (20 min.); MS; escuro (7 dias); E -T5 – LS (20 min); PVS2 (40 min); RL (90 min); RS (20 min.); MS; escuro (7 dias); F -T6 – LS (20 min); PVS2 (40 min); RL (90 min); NL (7 dias); RS (20 min.); MS; escuro (7 dias))..... 95
- Figura 11 Vitriificação ‘BRS Xingu’ e ‘Tupy’, aplicação das técnicas de resfriamento lento e ultrarrápido em explantes submetidos ao pré-condicionamento (aclimatização) em ambiente resfriado: A, E -T1 – Controle (MS+BAP 0,8 mg L-1+GA3 0,1 mg L-1), sem resfriamento; B, F- T2 – Controle pré-congelamento, LS (20 min) + PVS2 (40 min) + RS (20 min) + MS (MS+BAP 0,8 mg L-1+GA3 0,1 mg L-1), sem resfriamento; C, G -T3 - LS (20 min) + PVS2 (40 min) + NL (7 dias) + RS (20 min) + MS (MS+BAP 0,8 mg L-1 + GA3 0,1 mg L-1); D, H -T4 - LS (20 min) + PVS2 (40 min) +RL (60 min.) + NL (7 dias) + RS (20 min) + MS (MS+BAP 0,8 mg L-1+GA3 0,1 mg L-1)..... 98
- Figura 12 – Pré-condicionamento e vitriificação de cultivares de amoreira-preta (‘Comanche’, ‘Tupy’, ‘BRS Xingu’ e ‘BRS Caingá’), T1 - controle; T2 - LS, PVS2, NL com PVS2, BM, RS, MS; T3 - LS, PVS2, RL, NL com PVS2, BM, RS, MS; T4 – LS, PVS2, RL, NL, BM, RS, MS..... 103

## Lista de abreviaturas e siglas

- 2iP** – 2-isopenteniladenina  
**AA** – Ácido Ascórbico  
**AC** – Alginato de cálcio  
**ACNP** – Agentes crioprotetores não penetrantes  
**ACP** – Agentes crioprotetores  
**BAG** – Banco Ativo de Germoplasma  
**BAP** – 6-benzilaminopurina  
**BOD** – Biochemical Oxygen Demand  
**CA** – Carvão Ativado  
**CR** – Criticamente Ameaçada  
**DMSO** – Dimetilsulfóxido  
**ERO** – Espécies reativas de oxigênio  
**GA<sub>3</sub>** – Ácido giberélico  
**LCT** – Laboratório de Cultura de Tecidos  
**LS** – Solução de Carregamento (Loading Solution)  
**MM** – Meio de Multiplicação  
**MM2** – Meio de Multiplicação (MS + BAP 0,8 mg L<sup>-1</sup>+ GA<sub>3</sub> 0,1 mg L<sup>-1</sup>)  
**MPC** – Meio de Pré-Congelamento  
**MS** – Meio de Murashige e Skoog (1962)  
**MS-cálcio** – Meio MS sem cálcio  
**NL** – Nitrogênio Líquido  
**PEG** - Polietilenoglicol  
**PGD** – Solução de Congelamento Lento (PEG-Glicose-DMSO)  
**PVP** – Polivinilpirrolidona  
**PVS** – Plant Vitrification Solution (Solução de Vitriificação de Plantas)  
**PVS2** –Plant Vitrification Solution 2  
**PVS3** – Plant Vitrification Solution 3  
**RE** – Regionalmente Extinto  
**RL** – Resfriamento lento  
**RS** – Solução de Recuperação (Recovery Solution)  
**SO** – Solução osmoprotetora  
**RU** – Resfriamento ultrarrápido

## Sumário

Introdução .....	16
Revisão de Literatura .....	19
2 Taxonomia.....	20
2.1 Morfologia e fisiologia do gênero <i>Rubus</i> .....	20
2.2 Produção e comercialização .....	21
2.3 Importância ecológica: Preservação e conservação da biodiversidade .....	22
2.4 Melhoramento genético da amoreira-preta no Brasil .....	23
2.5 Cultivo in vitro .....	24
2.6 Reguladores de crescimento vegetais .....	25
2.7 Unidades encapsuláveis .....	26
2.8 Criopreservação.....	26
2.8.1 Soluções osmoprotetoras (SO).....	30
2.8.2 Solução de vitrificação de planta – plant vitrification solution (PVS).....	31
2.8.3 Novos crioprotetores .....	32
2.9 Criopreservação de <i>Rubus</i> .....	33
2.10 Técnicas de resfriamento ultrarrápido .....	34
2.10.1 Vitrificação .....	35
2.10.2 Encapsulamento-desidratação.....	36
2.10.3 Técnica da crioplaca .....	36
2.11 Pós-criopreservação.....	37
CAPITULO 1 .....	39
Encapsulamento-desidratação para o cultivo in vitro de amoreira-preta.....	39
Introdução .....	40
2 Material e Métodos .....	42
2.1 Material Vegetal .....	42
2.2 Cultivo e Multiplicação .....	42
2.3 Criopreservação de Unidades Encapsuláveis.....	42
2.3.1 Experimento 1: Composição da Cápsula – Fitorregulador e Carvão Ativado (CA) .....	44
2.3.2 Experimento 2: Composição da cápsula – Antioxidantes .....	46
2.3.3 Experimento 3: Composição do meio de regeneração .....	48
2.3.4 Experimento 4: Agentes desidratantes: encapsulamento-desidratação e crioplacas .....	50
2.3.5 Experimento 5: Tempo de exposição ao PVS2 .....	52
2.3.6 Experimento 6: Pré-condicionamento com sacarose ou dimetilsulfóxido (DMSO) .....	54
2.3.7 Experimento 7: Teste de PVS 2 e PVS3 e Resfriamento Lento e rápido.....	57
2.4 Análises estatísticas .....	59
3 Resultados e Discussão.....	60
3.1 Experimento 1: Composição da cápsula – fitorregulador e carvão ativado .....	60
3.2 Experimento 2: Composição da cápsula – antioxidantes.....	62

3.3 Experimento 3: Composição do meio de regeneração .....	65
3.4 Experimento 4: Agentes desidratantes: encapsulamento-desidratação e crioplasmas .....	68
3.5 Experimento 5: Tempo de exposição ao PVS2.....	72
3.6 Experimento 6: Pré condicionamento com sacarose ou DMSO .....	74
3.7 Experimento 7: Teste de PVS3 e resfriamento lento .....	75
4 Conclusões .....	78
CAPITULO 2 .....	79
Vitrificação – Agentes crioprotetores PGD ou PVS2 em métodos de criopreservação clássico e moderno para a conservação in vitro de amoreira-preta .....	79
Introdução .....	80
2 Material e métodos .....	82
2.1 Material Vegetal .....	82
2.2 Cultivo e Multiplicação .....	82
2.3 Vitrificação .....	82
2.3.1 Experimento 8 – Condicionamento com sacarose e DMSO, criopreservação com ou sem PGD e resfriamento lento .....	84
2.3.2 Experimento 9 – Vitrificação ‘BRS Xingu’, resfriamento rápido/lento.....	86
2.3.3 Experimento 10 – vitrificação ‘BRS Xingu’ e ‘Tupy’, resfriamento lento e rápido em ambiente resfriado.....	88
2.3.4 Experimento 11 – Pré-condicionamento e vitrificação de cultivares de amoreira-preta .....	90
2.4 Análises estatísticas .....	92
3 Resultados e Discussão.....	93
3.1 Experimento 8 – Condicionamento com sacarose e DMSO, criopreservação com ou sem PGD e resfriamento lento .....	93
3.2 Experimento 9 – Vitrificação ‘BRS Xingu’, Resfriamento Rápido/Lento.....	95
3.3 Experimento 10 – Vitrificação ‘BRS Xingu’ e ‘Tupy’, Resfriamento Lento e Ultrarrápido em Ambiente Resfriado .....	97
3.4 Experimento 11 – Pré-condicionamento e vitrificação de cultivares de amoreira-preta .....	100
5 Conclusão .....	104
Considerações finais .....	105
Referências Bibliográficas .....	108

## Introdução

A amora-preta, juntamente com a framboesa, pertencentes ao gênero *Rubus* e à família Rosaceae, fazem parte do complexo das pequenas frutas muito apreciadas em todo o mundo. Comercialmente são, em sua maioria, um complexo de espécies (híbridos) (FINN; CLARK, 2012). No Brasil, o estado do Rio Grande do Sul se destaca como o maior produtor, onde se estima que a produção foi de 2.350 toneladas em na safra 2017-2018, uma redução de 17 toneladas se comparada a safra anterior (2016/17) (PALUDO, 2018).

Os frutos são muito nutritivos e possuem propriedades nutracêuticas que auxiliam no combate aos radicais livres. Diversos estudos fitoquímicos e farmacológicos demonstraram que espécies de *Rubus* exercem efeitos gastroprotetores, antimicrobianos e citotóxicos (NAM et al., 2006; TOLENTINO, et al., 2015; SCHULZ et al., 2019). As propriedades nutracêuticas dos frutos são atribuídas à alta concentração de ácido elágico (C<sub>14</sub>H<sub>6</sub>O<sub>8</sub>), que possui função antioxidante, antimutagênica e anticancerígena (VIZZOTTO et al., 2012); e de substâncias fenólicas, flavonóides, aminoácidos, ácido ascórbico (CROGE et al., 2019) e terpenóides, que exibem importantes atividades antibacterianas e antinociceptivas (PITTARELLO et al., 2019; OSZMIANSKI et al., 2015; SCHULZ et al., 2019).

As frutas podem ser consumidas tanto in natura quanto em preparos culinários (KUHLMANN, 2012). Destacam-se por sua coloração, sabor e aroma (MARO et al., 2014; SCHULZ et al., 2019; SIRIWOHARN et al., 2019;), despertando elevado interesse nas espécies do gênero *Rubus* (CARPANEZZI; ZANONA; VOLTZ, 2019).

A pesquisa com amoreiras-pretas iniciou-se no Brasil na década de 1970, com a introdução de cultivares procedentes da Universidade de Arkansas no Centro de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado (CPACT) da Embrapa em Pelotas, no Rio Grande do Sul. A cultivar 'Tupy', lançada pelo programa em 1988, é a de maior área plantada no Brasil e uma das mais cultivadas no mundo (RASEIRA et al., 2021).

Tradicionalmente, a cultura era propagada por estacas de raiz, rebentos e hastes novas, que apresentam a desvantagem de elevado índice de disseminação de pragas e doenças. Por isso, desde a década de 80, visando contornar este problema, o Laboratório de Cultura de Tecidos (LCT) da Embrapa Clima Temperado iniciou a

aplicação de técnicas de micropropagação, como cultura de meristemas ou ápices caulinares, o que proporciona a obtenção de mudas de elevada qualidade fitossanitária para o programa de melhoramento genético (DUTRA et al., 2010).

Além da obtenção de mudas saudáveis, o LCT também realiza a conservação de parte do germoplasma de interesse de amoreira-preta. Porém, o simples cultivo *in vitro* destes materiais demanda mão-de-obra especializada para a realização de subcultivos frequentes e, ainda assim, há a possibilidade de contaminações e variação somaclonal e elevado custo com pessoal, equipamentos e material de consumo. Com isso, esforços vêm sendo realizados para melhorar e ampliar a conservação *in vitro*, como o uso de reguladores osmóticos adicionados ao meio de cultura em condições normais de sala de crescimento *in vitro* visando o crescimento lento. Esta técnica, entretanto, foi avaliada para apenas duas cultivares por 10 meses e demanda manutenção no médio prazo (FORMOSO, 2016).

A ferramenta biotecnológica mais importante de conservação genética a longo prazo, é a criopreservação, pois pode contornar problemas como doenças e danos ambientais capazes de afetar materiais conservados por outros métodos *ex situ*. A conservação em longo prazo proporciona vantagens como redução ou eliminação de danos genéticos, diminuição da necessidade de avaliações periódicas e controle da viabilidade, proporcionando a preservação de coleções por longos períodos, com segurança, baixo custo de manutenção e o armazenamento em pequenos volumes.

O banco de germoplasma do USDA, nos Estados Unidos, por exemplo, utiliza a conservação de material propagativo em nitrogênio líquido (-196 °C) para espécies de *Rubus* (REED, 2004). Neste tipo de sistema, o metabolismo das plantas é reduzido a um nível tão baixo que se considera paralisado. Por isso, uma vez tendo um protocolo estabelecido, a conservação pode se dar por um tempo indefinido, garantindo também a segurança genética do material.

Neste sentido, os objetivos deste trabalho foram avançar no conhecimento dos protocolos de criopreservação; aperfeiçoar técnicas de resfriamento para diferentes genótipos de amoreira-preta; ajustar e introduzir métodos de criopreservação nas rotinas do Laboratório de Culturas de Tecidos (LCT) da Embrapa Clima Temperado; realizar ensaios de pré-condicionamento, preparo e protocolos para encapsulamento-desidratação e vitrificação de tecidos vegetais do gênero *Rubus* pertencentes ao banco de germoplasma da Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, que é a detentora da maior coleção da cultura no Brasil; auxiliar no desenvolvimento de estratégias para

a manutenção, conservação e disponibilização de genitores de elevado potencial produtivo, genético e sanitário e em apoio aos programas de melhoramento genético e ao setor produtivo.

## **Revisão de Literatura**

## 2 Taxonomia

A família Rosaceae apresenta um grupo complexo de plantas que crescem em todas as partes do mundo. O gênero *Rubus* L. consiste em 250-700 espécies e ocorre em todos os continentes, exceto na Antártica (ALICE et al., 2014). A maioria das espécies estão distribuídas em regiões temperadas e subtropicais do hemisfério norte (LU, 1983; LU; BOUFORD, 2003), exceto por uma fração das espécies no hemisfério sul (RASEIRA et al., 2004; HUANG; HU, 2009; YIH; MING, 2009).

No Brasil, encontram-se poucas espécies nativas da família Rosaceae (7 gêneros e cerca de 25 espécies), limitação essa decorrente da maior adaptabilidade das plantas a regiões de clima temperado (CARPANEZZI; ZANONA; VOLTZ, 2019).

### 2.1 Morfologia e fisiologia do gênero *Rubus*

Morfologicamente, o gênero *Rubus* exibe enorme diversidade, com espécies variando de arbustos lenhosos, semi-lenhosos, eretos ou trepadeiras até subarbustos perenes anões rastejantes (ALICE; CAMPBELL, 1999; LU; BOUFORD, 2003).

A caracterização de espécies neste gênero é considerada por alguns pesquisadores como desafiadora taxonomicamente devido à agamospermia, poliploidia e hibridização (RICHARDS et al., 1996; WEBER, 1996; ALICE; CAMPBELL, 1999; ALICE; DODSON; SUTHERLAND, 2008). O único estudo taxonômico global de *Rubus* foi descrito por FOCKE (1910, 1911, 1914; apud XIAN-HUA et al., 2019), com base em caracteres morfológicos, dividindo o gênero em 12 subgêneros: *subg. Anoplobatus, Chamaebatus, Chamaemorus, Comaropsis, Cylactis, Dalibarda, Dalibardastrum, Idaeobatus, Lampobatus, Malachobatus, Orobatus e Rubus (= Eubatus)*.

Os três maiores subgêneros são *Idaeobatus, Malachobatus* e *Rubus*. Os dois primeiros estão principalmente distribuídos na Ásia (especialmente na China), enquanto o subgênero *Rubus* está disperso na Europa e América do Norte (LU, 1983).

Na América do Norte, o gênero *Rubus* foi estudado principalmente por Bailey (1941-1945 apud XIAN-HUA et al., 2019), que os dividiu em seis subgêneros, e por Alice et al. (2014). Na Europa, as espécies do subgênero *Rubus* foram estudadas

principalmente por Huber (1961), Heslop-Harrison (1968) e Weber (1996); na China, por sua vez, *Idaeobatus* e *Malachobatus* foram estudados e classificados em detalhes por Lu; Yu (1985) e Lu; Bouford (2003) (apud XIAN-HUA et al., 2019).

## 2.2 Produção e comercialização

As cultivares comerciais são, em sua maioria, um complexo de espécies (FINN; CLARK, 2012). Embora considerada minor crop, a área plantada com amoreira-preta tem crescido significativamente (CLARK; FINN, 2014) e, como consequência, o seu consumo também tem aumentado, principalmente nos Estados Unidos (SALGADO, 2016).

O Brasil destaca-se como potencial grande produtor, em função das condições edafoclimáticas favoráveis a amoreira-preta torna-se ótima opção para diversificação da produção agrícola. Nos últimos anos houve um constante avanço do cultivo de espécies de *Rubus* no Brasil, com um crescimento considerável em área plantada, principalmente na região sul do país, que apresenta características climáticas favoráveis para o cultivo (ANTUNES et al., 2014).

Os principais estados produtores são: Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná e Minas Gerais, sendo que no Rio Grande do Sul, no ano de 2018, a estimativa de produção foi de 2.350 toneladas em 239,2 ha (PALUDO, 2018). No Brasil, 'Tupy' é a mais cultivada, sendo essa também a cultivar mais importante mundialmente em áreas de inverno ameno (VOLK et al., 2013).

Considerando que a cultura possui facilidade no manejo, associada à reduzida utilização de agroquímicos e rápido retorno do investimento, observa-se o crescente interesse e curiosidade sobre o cultivo de espécies pertencentes ao gênero (ANTUNES et al., 2006; FAGUNDES et al., 2017; SOUZA, 2018), além de tornar o cultivo uma boa alternativa para a agricultura familiar (ANTUNES et al., 2006; FAGUNDES et al., 2017).

### 2.3 Importância ecológica: Preservação e conservação da biodiversidade

As espécies de *Rubus* têm papel de destaque na ecologia de formações naturais e na auto-reabilitação de áreas degradadas, indicando sua importância ecológica nos ecossistemas (CARPANEZZI; ZANONA; VOLTZ, 2019).

Observando-se a tendência nos últimos 100 anos, a perda da biodiversidade vegetal vem se tornando uma questão preocupante. Isto ocorre, entre outros fatores, devido à elevada conversão de áreas de vegetação primária para a exploração agrícola e à fragmentação de biomas juntamente com as mudanças climáticas (HOOPER et al., 2012; MANTYKA-PRINGLE et al., 2012; VELLEND et al., 2017).

Os maiores riscos de condições climáticas extremas como secas e tempestades são eventos aos quais os biomas estão expostos; apesar dos esforços para a conservação da biodiversidade, a elevação da temperatura global aumenta a taxa de renovação de algumas espécies e diminui a área média de todas as espécies (ALKEMADE; BAKKENES; EICKHOUT, 2011).

A preservação de plantas deve ser uma prioridade. A perda da variabilidade genética limita a capacidade das plantas de responder às mudanças climáticas e favorece o aparecimento de novas pragas e doenças (ROQUE-BORDA et al., 2021). Devido à atividade humana, a população natural de *Rubus humulifolius* desapareceu em 1957 das áreas onde era encontrada (norte da Eurásia, desde o Lago Onega até a costa do Oceano Pacífico). Ao longo dos anos, reintroduções com material vegetal foram realizadas, mas sem sucesso. Em 1986, um projeto de micropropagação foi iniciado e uma reintrodução bem-sucedida na natureza em Jyväskylä, em uma área de preservação na Finlândia (KYPÄRÄ; 2012 apud EDESI et al., 2020).

As plantas *R. humulifolius* da população em Jyväskylä são mantidas in vitro no Jardim Botânico da Universidade de Oulu desde 2006 (20 plântulas, todas representando um clone de *R. humulifolius*). Apesar da presença desta população reintroduzida, *R. humulifolius* foi classificada como regionalmente extinta (RE) e, mais recentemente, como criticamente ameaçada (CR) na Finlândia (HYVÄRINEN et al., 2019).

A conservação ex situ pode ser usada como método complementar à preservação in situ, através da implantação de coleções de campo, banco de sementes ou bancos ativos de germoplasmas (BAGs) in vitro dos materiais mais vulneráveis de determinada espécie, protegendo o material genético e garantindo a

manutenção ao longo do tempo em condições viáveis (LI; PRITCHARD, 2009; ROQUE-BORDA et al., 2021). Entretanto, a implantação, desenvolvimento e manutenção destes espaços (repositórios de campos clonais, jardins botânicos, bancos de sementes e coleções in vitro), apresentam um elevado custo, visto que são estruturas que demandam mão-de-obra especializada constantemente (AMANO et al., 2020).

## **2.4 Melhoramento genético da amoreira-preta no Brasil**

No Brasil, o melhoramento genético da amoreira-preta teve início no final da década de 70 (1978) a partir de uma colaboração com a Universidade de Arkansas (EUA). Posteriormente, foram introduzidos materiais provenientes do Uruguai e pólen e sementes do USDA (Oregon) e da Universidade de Arkansas (RASEIRA et al., 2021).

Desde o início dos trabalhos, o programa de melhoramento genético da amoreira-preta da Embrapa Clima Temperado focou seus esforços na busca por materiais adaptados às condições climáticas do sul do Brasil. Os esforços realizados tiveram como objetivos a busca por cultivares com baixas necessidades de frio hibernal, boa resistência a doenças, produção de frutos de elevada firmeza e de bom tamanho, com boa conservação pós-colheita (RASEIRA et al., 2021).

Como resultado dessa colaboração, surgiram as primeiras cultivares desenvolvidas pela Embrapa: Ébano em 1981, Negrita em 1983 (atualmente obsoleta), 'Tupy' e Guarani em 1988, Caingangue em 1992, Xavante em 2004, 'BRS Xingu' em 2015 (RASEIRA; FRANZON; SCARANARI, 2018) e, mais recentemente, 'BRS Caingá' (2018) (RASEIRA et al., 2020).

A cultivar de maior adoção e impacto comercial derivada deste programa é a 'Tupy', que é a cultivar de maior área plantada no Brasil e uma das mais plantadas no mundo, devido principalmente à sua capacidade de adaptação em condições de inverno ameno, à qualidade das frutas e à produtividade. Adicionalmente a isso, a cultivar tem relativa facilidade em ser manejada em regiões subtropicais em sistema de produção forçada (VOLK et al., 2013; RASEIRA et al., 2021).

## 2.5 Cultivo in vitro

O cultivo in vitro consiste em um conjunto de diferentes técnicas que se apresentam como uma alternativa para a propagação de espécies de plantas, possibilitando a preservação e a reprodução das características desejáveis da planta matriz. Consiste em diversas técnicas que permitem, por exemplo, a propagação de espécies com dificuldade de germinação ou que não produzem descendentes de forma sexuada; a produção massal ou, ainda, a inclusão de espécies em bancos de germoplasma, aumentando assim a facilidade de troca de material genético entre instituições de pesquisa (PINHAL et al., 2011; KELLER et al., 2013; JUNGHANS; SOUZA, 2018, DIAS et al., 2014).

Os estudos sobre a propagação in vitro de espécies de *Rubus* na Embrapa Clima Temperado começaram na década de 1970 (SNIR, 2011). Os principais esforços foram focados em framboesa (*R. idaeus* L.), amoreira-preta (*Rubus* sp.) e híbridos entre elas. O cultivo in vitro facilita a produção uniforme e reduz o tempo de propagação, não dependendo das condições climáticas e sendo especialmente útil em espécies que apresentam sementes recalcitrantes, as quais rapidamente perdem sua viabilidade (KELLER, et al., 2013; ISMAINI; DESTRI; SURYA, 2017).

A micropropagação traz o benefício de se multiplicar genótipos superiores, permitindo a produção de mudas idênticas às plantas-matrizes, alcançando uniformidade em relação às suas características genéticas, facilitando os tratamentos culturais e aumentando assim a produção (DUTRA et al., 2010). Além disso, quando se realiza a limpeza clonal, a partir da introdução de meristemas ou utilizando técnicas de termo ou crioterapia, o cultivo in vitro permite a manutenção e propagação de plantas isentas de viroses.

O cultivo in vitro da amoreira-preta na Embrapa Clima Temperado é utilizado desde 1988, sendo um método para manutenção da coleção de trabalho e para a clonagem dos materiais de interesse, produção de mudas para intercâmbio com outras instituições e, principalmente, buscando a limpeza virótica do material vegetal de interesse da instituição. Atualmente várias cultivares e seleções de interesse são mantidas in vitro prontamente disponíveis ao programa de melhoramento genético da Embrapa Clima Temperado, a projetos de pesquisa e a conservação dos genótipos de interesse.

## 2.6 Reguladores de crescimento vegetais

O sucesso da cultura de tecidos depende de vários fatores, tais como: o equilíbrio na utilização de reguladores de crescimento, disponibilidade de nutrientes, além de fotoperíodo, qualidade de luz e temperatura (PINHAL et al., 2011). A utilização de reguladores de crescimento junto ao meio de cultura é um dos principais fatores que contribuem para a indução do crescimento e multiplicação das plantas. A concentração ideal de citocinina, por exemplo, apresenta efeitos positivos na indução de brotações de *Rubus*; no entanto, se em excesso, esse regulador pode acarretar problemas de hiperidricidade, inibição do alongamento dos brotos e calogênese em plantas de amoreiras (HUNKOVÁ; LIBIAKOVÁ; GAJDOŠOVÁ, 2016).

O uso de reguladores de crescimento vegetais é comum em cultura de tecidos, as concentrações são alteradas de acordo com a demanda da cultura ou fase de cultivo. Na etapa de multiplicação, por exemplo, um estudo de Oliveira; Nino (2007), estudando sete cultivares de amoreira-preta: Brazos, Cherokee, 'Comanche', Ébano, Guarani, 'Tupy' e Xavante, obtiveram diferentes respostas de acordo com a cultivar, sendo que o número estimado de plantas produzidas, após 6 subcultivos de 40 dias, foi de 16.335 para 'Brazos', 24.211 para 'Cherokee', 19.778 para 'Comanche', 106.550 para 'Ébano', 14.275 para 'Guarani', 34.022 para "Tupy" e 24.651 para 'Xavante'.

Na intenção de se aumentar o número de brotações na cultivar Chester Thornless, Kefayeti; Kafkas; Ercisl, (2019), propuseram a adição de  $8,8 \mu\text{mol L}^{-1}$  BAP (6-benzilaminopurina) +  $0,9 \mu\text{mol L}^{-1}$  AIB (ácido indolbutírico) ao meio de cultura. Enquanto para a cultivar Ébano apenas  $4,4 \mu\text{mol L}^{-1}$  de BAP e meio MS (acrescido com sais em mais 50%) são necessários para se aumentar a produção de brotações (VILLA et al., 2005), no entanto, para 'Xavante' a maior taxa de brotação foi alcançada em meio MS suplementado com  $15 \mu\text{mol L}^{-1}$  de BAP (LEITZKE; DAMIANI; SCHUCH, 2010).

Para a amoreira-preta 'BRS Xingu', a concentração de  $5 \mu\text{mol L}^{-1}$  de BAP foi efetiva, apresentando também o aumento no número das brotações entre os sucessivos subcultivos (SCHIEHLA; FRANÇA; BIASI, 2019).

## **2.7 Unidades encapsuláveis**

A biotecnologia tem fornecido diversas opções de preservação da biodiversidade, como técnicas de cultivo *in vitro* e produção de sementes sintéticas ou unidades encapsuláveis, que consiste em encapsular embriões somáticos, ápices caulinares ou gemas axilares (CID, 2004; ENGELMANN, 2011). O encapsulamento de embriões somáticos em cápsulas de hidrogel para a constituição de sementes sintéticas foi proposto por Redenbaugh et al. (1986) e tem como vantagens principais a proteção dos embriões somáticos, o fácil armazenamento, transporte e conversão em plantas (GUERRA; TORRES; TEIXEIRA, 1999).

O sucesso da propagação através de unidades encapsuláveis é altamente influenciado pela composição utilizada na formação da cápsula. A cápsula é a responsável pela proteção e a disponibilização de nutrientes para o explante. A disponibilização de nutrientes pela cápsula facilita o crescimento e sobrevivência do explante e possibilita sua germinação (SINGH et al., 2010).

Apesar de todo o potencial da técnica, são relativamente poucos os estudos acerca do tipo de explante, constituição e consistência da cápsula, condições de cultivo e armazenamento das unidades encapsuláveis. Em geral, as pesquisas sobre encapsulamento envolvem o emprego de embriões somáticos como fonte de explantes (CASTILLO et al., 1998; ARA; JAISWAL; JAISWAL, 1999).

## **2.8 Criopreservação**

A criopreservação é um método de conservação genética a longo prazo. É uma importante ferramenta de armazenamento desenvolvida há poucas décadas e amplamente utilizada em bancos de germoplasmas atuais, por exemplo: NCGRP – USDA, nos Estados Unidos; EMBRAPA, no Brasil; CIAT, na Colômbia; CRI, na República Tcheca; InHort, na Polónia; NARO, NIAS, NCSS, no Japão, dentre outros (REED, 2004; RUTA; LABARDI; OZUDOGRU, 2020).

A criopreservação se destaca como um método onde a possibilidade de preservação e conservação de germoplasma de interesse é possível mesmo para espécies que não podem ser armazenadas em bancos de sementes, como culturas clonais, espécies com baixo número de sementes ou recalcitrantes.

Apesar de exigir operador treinado e materiais específicos, os esforços de manutenção são mínimos e permitem o armazenamento e sobrevivência dos germoplasmas por períodos muito longos. A Tabela 1 traz uma lista de culturas de interesse já criopreservadas.

Tabela 1 – Culturas de interesse agrônomo em que protocolos de criopreservação demonstraram eficiência na preservação e regeneração. COPATTI (2021).

<b>Material Biológico</b>	<b>Explante</b>	<b>S(R) %</b>	<b>Referência</b>
<b>Vitrificação</b>			
<i>Allium sativum</i> 'Galiang-suan' cv. G064	Ápices caulinares	82,6 (75,9)	LIU et al. (2017)
<i>Solanum tuberosum</i> (28 genótipos)	Ápices caulinares	(até 54)	KÖPNICK et al. (2018)
<i>Vitis</i> spp. (uva)	Meristema	(até 86,7)	MATSUMOTO e SAKAI (2003)
<i>Fragaria</i> (morango)	Ápices caulinares	93	NIINO et al. (2003)
<b>Droplet-vitrification</b>			
<i>Allium cepa</i> 'Kverve' 'Lunteviga'	Ápices caulinares	(45-70)	WANG et al. (2019)
<i>Helianthus tuberosus</i> 'M6' 'Relikt' 'Shudi' 'Stampede'	Ápices caulinares	98(83)	ZHANG et al. (2017)
<i>Oxalis tuberosa</i> e <i>Ullucus tuberosus</i>	Ápices caulinares	15 e 35	SÁNCHEZ et al. (2011)
<i>S. tuberosum</i> 'Agrie dzeltenie' 'Anti' 'Bintje' 'Désirée' 'Maret'	Ápices caulinares	17,1-52,6	EDESI et al. (2014)
<b>Encapsulamento-vitrificação</b>			
<i>S. tuberosum</i> 'Blue Congo' 'E03-267'	Gemas	(40-80)	LI et al. (2017)
<i>Fragaria</i> (4 cultivares)	Meristema	(95)	HIRAI et al. (1998)
<b>Encapsulamento-desidratação</b>			
<i>Asparagus officinalis</i> 'Morado de huétor'	Gemas de rizoma	34,5-84	CARMOMA-MARTÍN et al. (2018)
<i>Actinidia</i> spp. e híbridos	Ápices culinares	(Até 95)	BACHIRI et al. (2001)
<i>Ribes</i> spp.	Ápices caulinares	(Até 92)	REED et al. (2005)
<i>Rubus</i> (18 genótipos amoreira-preta e framboeseira)	Ápices caulinares	Até 100	GUPTA e REED (2006)
<b>Crioplaca</b>			
<i>Allium</i> spp.	Ápices caulinares (2,5 mm)	94	TANAKA et al. (2021)
<i>S. tuberosum</i> 'Sayaka'	Ápices caulinares (0,5-1,5 mm)	93,3	YAMAMOTO et al. (2015)

S(R): Sobrevivência (Recuperação).

Em espécies em que há um domínio do condicionamento do material vegetal, a criopreservação pode contornar problemas como doenças e danos ambientais capazes de afetar materiais conservados por outros métodos; além disso, apresenta vantagens como a viabilidade e a integridade genéticas do material vegetal por um

longo período. O material é armazenado em pequenos volumes e pode permanecer viável por tempo ilimitado, reduzindo as avaliações periódicas (ENGELMANN, 2011; PENCE, 2011; PRUDENTE; PAIVA, 2017).

São descritos dois métodos de criopreservação:

No método clássico, o resfriamento ocorre de forma lenta e controlada ( $0,1-2,0$  °C  $\text{min}^{-1}$ ) até  $-40$  °C (ou menos frequentemente  $-20$  °C); então, por imersão em nitrogênio líquido, faz-se um resfriamento rápido até a temperatura de criopreservação ( $-150$  a  $-196$  °C). As desvantagens deste método incluem a complexidade da operação, o uso de equipamentos caros e sofisticados que controlam a taxa de resfriamento e a formação de cristais de gelo em soluções extracelulares, causando perda de água pelas células no chamado processo de desidratação por congelamento (KIM et al. 2004; WANG et al., 2014).

O método moderno de criopreservação é baseado em procedimentos de vitrificação, onde a solidificação das soluções e tecidos vegetais se dá através do processo de resfriamento ultrarrápido. É um processo físico no qual uma solução aquosa se solidifica em um sólido metaestável amorfo; nesse estado, a formação de cristais de gelo é minimizada ou inibida (VOLK; WALTERS; 2006; BEKHEET et al., 2020; NADARAJAN et al., 2020).

Vitrificação é o processo que modifica a viscosidade de uma solução para evitar a ocorrência de nucleação<sup>1</sup> e a formação de cristais de gelo em baixas temperaturas (WOWK, 2010). Essa técnica envolve uma prévia desidratação física ou osmótica dos explantes. A remoção total ou parcial da água passível de congelamento evita a formação de cristais de gelo intracelular. Para atingir esse objetivo, as células necessitam ser desidratadas artificialmente utilizando-se substâncias crioprotetoras (GONZALEZ-ARNAO, et al., 2008; ENGELMANN, 2011).

A redução do teor de água e osmoproteção dos explantes são necessárias para se obter a viscosidade extrema dos solutos intra e extracelulares dos tecidos vegetais, interrompendo, assim, todas as reações químicas que requerem difusão molecular, permitindo a estabilidade e latência de explantes ao longo do tempo (COELHO, 2017; KULUS, 2015; TANAKA; NIINO; UEMURA., 2018; ACOSTA et al., 2020). Para se chegar a essa condição são utilizados agentes crioprotetores (ACPs).

---

<sup>1</sup> Nucleação: nucleação heterogênea ocorre em sistemas biológicos quando cristais de gelo são formados (cerca de  $-5$  a  $-20$  °C); o processo de nucleação homogênea (a menos de  $-40$  °C) ocorre quando este conjunto de moléculas se auto associam e formam gelo nucleado.

Os ACPs, promovem o aumento da osmolaridade e redução da quantidade de água livre dos tecidos vegetais. São empregados dois grupos de crioprotetores subdivididos de acordo com suas propriedades e funcionalidades, sendo caracterizados como penetrantes e não penetrantes:

ACPs Penetrantes – compostos de baixo peso molecular (32-212) que possuem a capacidade de permear a membrana celular, atuando essencialmente no protoplasto, substituindo a água intracelular antes e durante o resfriamento, diminuindo o ponto de congelamento e reduzindo a formação e crescimento de cristais de gelo (ELLIOTT; WANG; FULLER, 2017). ACPs penetrantes também trabalham formando ligações de hidrogênio com moléculas biológicas à medida em que as moléculas de água são deslocadas. Os ACPs penetrantes mais comumente utilizados são o glicerol, dimetilsulfóxido (DMSO) e 1,2-propanodiol (propilenoglicol) (TEIXEIRA; GONZÁLEZ-BENITO; MOLINA-GARCÍA, 2013).

ACPs não penetrantes – são substâncias de alto peso molecular, que não podem penetrar na célula ou entram nela com extrema dificuldade; formam ligações de hidrogênio com a água, reduzindo as forças iônicas fora da célula e diminuindo moderadamente a formação de cristais de gelo. Promovem uma desidratação celular rápida devido ao seu poder osmótico. Os ACPs não penetrantes incluem carboidratos como polissacarídeos, sacarose e glicose sendo os mais usados, os açúcares álcoois (manitol, sorbitol). Sua máxima eficácia é alcançada quando esses são combinados com ACPs penetrantes (WANG et al., 2000; BAHR et al., 2020).

### **2.8.1 Soluções osmoprotetoras (SO)**

SO são obtidas pela mistura de ACPs penetrantes e não penetrantes. As soluções podem ter baixa ou moderada concentração. A solução mais comumente utilizada foi descrita por Nishizawa et al. (1992) e é conhecida por LS (Loading Solution – solução de carregamento). Essa solução é composta por glicerol ( $2 \text{ mol L}^{-1}$ ) e sacarose ( $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ ). Além da LS, outras SO são conhecidas, compostas por sacarose, glicerol, DMSO e/ou etilenoglicol em várias concentrações e combinações, como demonstrado na Tabela 2.

Tabela 2 – Soluções Osmoprotetoras mais comumente utilizadas: adaptado de (ROQUE-BORDA et al., 2021).

Solução	Composição (%; v/v)		
	DMSO	Glicerol	Sacarose
LS1	-	18,4	13,7
LS2	5	13,8	13,7
LS3	10	4,6	10,3
LS4	10	-	24

As LS possuem o papel de preparar biofísicamente os tecidos vegetais para o estresse osmótico antes da severa desidratação à qual serão expostos com a adição dos ACPs, expondo-os primeiramente a uma solução moderadamente concentrada (KIM et al., 2009). A sacarose atua como um protetor da membrana citoplasmática, contra a desidratação causada pelo congelamento (PANIS et al., 2002). O glicerol neutraliza o estresse osmótico, devido ao seu efeito permeável mais lento, na membrana celular, em comparação com outros crioprotetores, permitindo que a água escape e desidrate parcialmente a célula (NADARAJAN et al., 2008; TEIXEIRA et al., 2014). Pelos efeitos hipertônicos conferidos, ou seja, a concentração externa é maior que a do interior das células, ocasiona a saída da água do vacúolo, fluindo em direção ao meio hipertônico (osmose) desidratando as células e reduzindo seu tamanho.

### 2.8.2 Solução de vitrificação de planta – plant vitrification solution (PVS)

As PVS são usadas em todas as técnicas modernas de criopreservação devido às suas características e aos seus efeitos protetores. Em baixas temperaturas, a viscosidade das PSV aumenta, formando um estado vítreo amorfo sem que ocorra a formação de gelo (TEIXEIRA et al., 2014). Muitas variações das PVS são conhecidas, como demonstra a Tabela 3. Os compostos da PVS modificam a temperatura de transição para o estado vítreo, evitando a formação de cristais de gelo intracelulares (SAKAI; KOBAYASHI; OIYAMA, 1990).

Na maioria das PVSs o DMSO é utilizado como solvente devido à sua bipolaridade, solubilidade em água e ser aprótico (sem ligações O – H ou N – H), não doando nem recebendo elétrons. Tem como principal efeito a capacidade de evitar o acúmulo excessivo de eletrólitos e outras substâncias durante o processo de resfriamento e, pelo seu baixo peso molecular, adentra a membrana celular, modulando a estabilidade da bicamada fosfolipídica. A interação do DMSO com os

fosfolipídios é mostrada como crítica para a crioproteção da membrana (SPEECKAERT; BORGES; GYPENS, 2019; WOHNHAAS et al., 2019).

Tabela 3 – Composição das principais soluções de vitrificação: adaptado de (ROQUE-BORDA et al., 2021).

Solução	Composição (%; v/v)					
	Sorbitol	Etilenoglicol	DMSO	Polietilenoglicol	Glicerol	Sacarose
PVS1	9,1	15,0	7,0	15,0	22,0	-
PVS2	-	15,0	15,0	-	30,0	13,7
PVS3	-	-	-	-	50,0	50,0
PVS4	-	20,0	-	-	35,0	20,5
L-solution	-	30,0	7,0	-	22,0	15,0
T-solution	-	35,0	7,8	10,0	-	-
W-solution	18,7	-	44,5	-	-	-

O etilenoglicol (EG) é também utilizado como crioprotetor pois possui alto coeficiente de permeabilidade celular. Ele age evitando a super-hidratação dos tecidos após o reaquecimento das amostras. Quando da utilização do EG em tratamentos, esses devem ser realizados rapidamente, pois esse composto é mais tóxico se comparado ao glicerol (KULUS; ZALEWSKA, 2014).

O polietilenoglicol (PEG) é um polímero crioprotetor não penetrante que, além de inibir o crescimento de cristais de gelo, evita que o material vegetal sofra lesões causadas pelo frio devido ao aumento da tonicidade de PVS (POMEISL et al., 2020). O PEG funciona bem em associação com DMSO segundo evidências apontadas por Bekheet et al. (2020); ou com derivados de trealose, que podem modificar os eventos termodinâmicos ao aderir com o PEG (POMEISL et al., 2020).

### 2.8.3 Novos crioprotetores

Mais recentemente surgiu uma nova linha de ACPs, chamados de crioprotetores modernos:

Existem compostos que são derivados de lipossomas nanométricos fosfolipídios de origem vegetal (soja) e animal (gema de ovo) que têm sido utilizados como crioprotetores altamente eficientes em induzir tolerância ao resfriamento produzido pelo armazenamento de células animais em nitrogênio líquido,

especialmente quando o material é encapsulado em alginato de cálcio (SHISHOVA et al., 2020).

Para aumentar a eficiência da criopreservação e fornecer uma alternativa ao DMSO, Wang et al., (2001) observaram efeitos variáveis utilizando concentrações da proteína anticongelante de peixe AFP-I na criopreservação embriogênica de arroz (*Oryza sativa* L.) e interação com outros ACPs.

A utilização de nanopartículas é pouco relatada para a criopreservação de células de plantas, sendo mais bem elucidada para o uso em células animais e até mesmo humanas; porém, alguns estudos como o de Montalbán et al. (2018) relatam a inclusão de nanopartículas de prata em meio de cultura e em crioprotetor para armazenamento em ultrafreezer (-80 °C) de embriões de *Pinus radiata*, obtendo 75% de recuperação.

A adição de nanotubos de carbono de parede única ao PVS melhorou a taxa de sobrevivência celular e reduziu o estresse oxidativo em calos embriogênicos criopreservados de *Agapanthus praecox* Willd (REN et al., 2020). Já Kulus; Tymoszuk (2021) relatam que a adição de nanopartículas de ouro à matriz de alginato aumentou a capacidade de sobrevivência de ápices caulinares de *Lamprocapnos spectabilis* L. em até 20%.

## 2.9 Criopreservação de *Rubus*

Mais de 200 espécies vegetais, dentre elas algumas do gênero *Rubus*, já foram criopreservadas com sucesso (ENGELMANN, 2004; MATSUMOTO, 2017). A maior coleção de materiais criopreservados do gênero *Rubus* é mantida pelo USDA-ARS National Clonal Germplasm Repository em Corvallis/Oregon. A coleção inclui mais de 200 espécies e híbridos: *R. allegheniensis*, *R. amphidasys*, *R. arcticus nothosub sp. stellarcticus*, *R. armeniacus*, *R. axillaris*, *R. caesius*, *R. cissoides*, *R. corchorifolius*, *R. crataegifolius*, *R. cyri*, *R. drejeri*, *R. erythrops*, *R. georgicus*, *R. grabowskii*, *R. hirsutus*, *R. hirtus*, *R. x hybrid*, *R. idaeus*, *R. illecebrosus*, *R. insularis*, *R. laciniatus*, *R. misztschenkoi*, *R. multi-bracteatus*, *R. occidentalis*, *R. palmatus*, *R. parvifolius*, *R. spectabilis*, *R. ulmifolius*, *R. ursinus*, e *R. wahlbergii*, totalizando mais de 200 genótipos até o ano de 2013 (UKHATOVA et al., 2017).

A literatura relata a influência do genótipo na regeneração dos explantes após aplicação das técnicas de criopreservação. Trabalhos já foram realizados; porém,

poucos são os protocolos de criopreservação eficientes utilizados rotineiramente para a conservação de longo prazo (OCHATT et al., 2021). Diferentes taxas de regeneração de *Rubus* são apresentadas. Wang et al. (2005), ao avaliar quatro espécies e três híbridos de framboeseiras, obtiveram entre 50-85% com média de 68%. Por sua vez, Gupta; Reed, (2006) e Reed (2008), ao avaliar espécies, híbridos e cultivares de *Rubus* pertencentes ao NCGR – USDA/EUA, obtiveram 45–78% (média 61,5%) e 60-100% (média 85%), de regeneração ao empregarem as técnicas de vitrificação e encapsulamento-desidratação respectivamente.

As respostas obtidas por Kovalchuk et al. (2010) ao observar o comportamento pós criopreservação de oito cultivares e três seleções de framboeseira vermelha, demonstraram taxas de 20 a 81% (média 60,5%) de regeneração. Utilizando a metodologia de vitrificação em gota de DMSO aperfeiçoada, Ukhatova et al. (2017) observaram taxas variáveis de regeneração ao avaliarem a recuperação de doze genótipos de *Rubus* sp. pertencentes ao Instituto Russo de Recursos Genéticos de Plantas (N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR)), com taxa média de regeneração de 58,8%), porém, com variação entre os genótipos de 24,2-89,3%.

## 2.10 Técnicas de resfriamento ultrarrápido

Os métodos de criopreservação, como relatado anteriormente, são classificados de acordo com a velocidade com que os tecidos vegetais são submetidos ao resfriamento. A taxa de resfriamento não é o único fator que afeta a formação e o tamanho dos cristais de gelo intra e extracelulares durante o processo de criopreservação (KIM et al. 2004; WANG et al., 2014; ROQUE-BORDA et al., 2021).

O resfriamento lento oferece uma maior taxa de perda de água da célula, minimizando a formação de gelo e maximizando a concentração de ACP, que dependendo dos elementos utilizados pode vir a se tornar tóxica aos tecidos vegetais. Por outro lado, o resfriamento rápido minimiza a concentração de soluto, porém maximiza a formação de cristais de gelo, pois a água poderá não ter migrado suficientemente para fora das células (VOLK; WALTERS; 2006; BEKHEET et al., 2020; NADARAJAN et al., 2020).

Atualmente os métodos mais comuns são baseados no resfriamento ultrarrápido. A seguir serão descritas sucintamente as técnicas empregadas no presente trabalho (Figura 1):

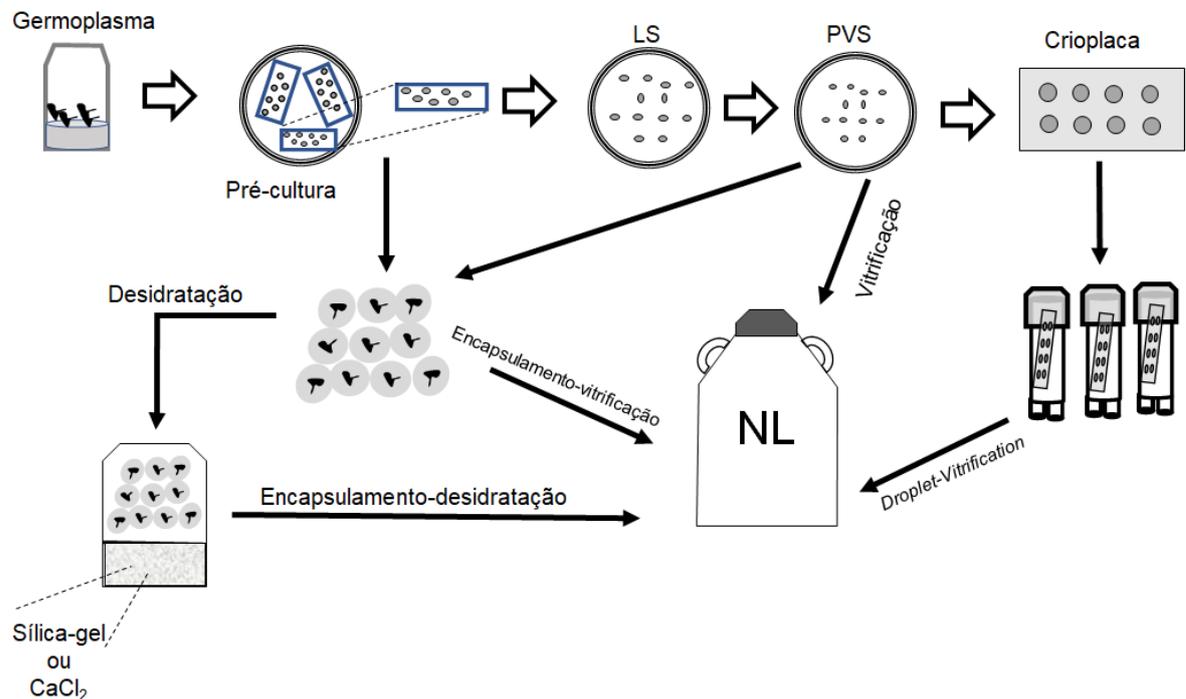


Figura 1 - Esquema representativo dos métodos modernos de criopreservação (LS – Loading solution; PVS – Plant vitrification solution; NL – Nitrogênio líquido).

Fonte: Adaptada de Roque-Borda (2021).

### 2.10.1 Vitrificação

É baseada no tratamento do explante em meio de pré-cultivo (PC), que geralmente contém sais do meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), um agente gelificante (ágar ou fitigel) e sacarose em alta concentração (geralmente 6–9% p / v).

Nessa etapa ocorre a elevação do metabolismo antioxidante que promove tolerância ao estresse, especialmente à desidratação (DIGILIO, 2014). Pode-se realizar adicionalmente uma etapa de condicionamento a frio antes ou durante o pré-cultivo a baixas temperaturas ou em regime de alternância de temperaturas dia/noite, por uma a três semanas. Para algumas espécies de clima temperado ou tropical, essa etapa é importante, como demonstrado por Mathew et al. (2019), os quais observaram que, ao realizarem o condicionamento a frio de ápices de kiwi (*Actinidia chinensis*

Planch) pré-tratados com sacarose e ácido ascórbico, obtiveram recuperação de 40%, enquanto os ápices que não foram pré-tratados não sobreviveram.

Posteriormente os tecidos vegetais são tratados com uma solução de carregamento (LS), geralmente por 20 minutos, seguindo da exposição direta ao PVS (BI et al., 2017). A exposição ao crioprotetor é variável, devendo ser empregada de acordo com o tipo de explante e PVS utilizada, podendo variar de 20-40 minutos quando a PVS contenha DMSO ou até 180 minutos quando empregada solução sem DMSO (TEIXEIRA, 2014; DIGILIO, 2014).

Após essa etapa, os explantes desidratados estão aptos a serem colocados em criotubos e imersos em nitrogênio líquido (BI et al., 2017).

### **2.10.2 Encapsulamento-desidratação**

Algumas espécies de plantas não resistem às condições de criopreservação e tratamento com PVS. Assim, foi desenvolvida uma metodologia na qual o explante segue um processo de encapsulamento por geleificação iônica. Nesta técnica, o material vegetal é inserido em uma matriz de alginato de sódio (2–5% v / p) e com uma pipeta é gotejado sobre uma solução catiônica de cloreto de cálcio II (100 mmol L<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub>), por aproximadamente 30 minutos para formar cápsulas protetoras para os explantes.

Os tecidos vegetais encapsulados são desidratados osmoticamente, podendo ser em soluções com concentrações crescentes de sacarose, que chegam até à concentração de 1 mol L<sup>-1</sup>, ou fisicamente em sílica-gel ou em câmara de fluxo laminar, obtendo-se ao final do processo cápsulas contendo de 10 a 30% do conteúdo inicial de umidade e assim estando aptas a serem imersas em nitrogênio líquido (KULUS; ZALEWSKA, 2014; IBÁÑEZ, et al., 2019).

### **2.10.3 Técnica da crioplaca**

As técnicas de crioplacas foram desenvolvidas por Yamamoto et al. (2011) e Niino et al. (2013) mesclando os métodos de vitrificação e de encapsulamento para fornecer estabilidade e maior tolerância do explante às mudanças bruscas de temperatura. Utilizam-se pequenas placas confeccionadas em alumínio contendo poços esféricos onde são depositados os tecidos sobre uma gota de alginato, para

posteriormente, serem desidratados por PVS, fluxo laminar ou sílica-gel. As placas facilitam o manuseio durante os processos de criopreservação e reaquecimento e minimizam a perda de explantes por lesões.

## 2.11 Pós-criopreservação

Nessa etapa busca-se uma regeneração satisfatória (ao menos 40%) após a criopreservação. Dito isso, os tratamentos pós-criopreservação são tão importantes quanto as etapas iniciais.

O aquecimento dos materiais vegetais pode ser realizado à temperatura ambiente ou rapidamente (água aquecida a 35-45°C), visando evitar a recristalização do gelo (agregação de cristais menores em maiores) (ROQUE-BORDA et al., 2021).

As PVS são altamente eficazes para a desidratação, prevenindo a cristalização da água no interior das células. No entanto, alguns componentes das soluções são tóxicos para as células (por exemplo o DMSO), como relatado acima. Consequentemente, tem-se a necessidade de se realizar a completa remoção da solução PVS dos explantes para que esses não sofram uma desidratação descontrolada após o reaquecimento (VOZOVYK et al., 2020).

Após o reaquecimento, os tecidos devem ser lavados com uma solução concentrada de sacarose, geralmente formulada a partir dos sais do meio MS líquido com a adição de 1,2 mol L<sup>-1</sup> de sacarose. A solução de descarregamento ou regeneração (RS) foi descrita por Sakai; Kobayashi; Oiyama; (1990). A manutenção das temperaturas dos tecidos vegetais e das soluções durante os processos de desidratação e reidratação podem apresentar efeito benéfico na sobrevivência do material submetido à imersão em nitrogênio líquido (FÁBIÁN et al., 2008).

O meio de regeneração tem papel fundamental no reestabelecimento da planta, controlando os processos totipotenciais de crescimento e desenvolvimento de células e tecidos. Para realizar a recuperação dos explantes é indicada a utilização de meio com potencial osmótico aumentado e com a adição de fitorreguladores apropriados, como ácido giberélico (GA), durante os primeiros dias de recuperação (KULUS, 2019).

Do mesmo modo, deve-se levar em consideração as condições da sala de crescimento. A quantidade e a qualidade da intensidade luminosa, fotoperíodo e composição espectral afetam as respostas morfogenéticas das plantas in vitro. A modificação dos espectros de luz, antes do armazenamento em NL e durante a

recuperação após a criopreservação, podem ocasionar aumento na sobrevivência e na recuperação dos tecidos criopreservados (YOON et al., 2009).

É relatada na literatura a influência do genótipo na regeneração dos explantes, após aplicação das técnicas de criopreservação. Diversos trabalhos já foram realizados; porém, poucos são os protocolos de criopreservação eficientes utilizados rotineiramente para a conservação de longo prazo (OCHATT et al., 2021).

O sucesso da criopreservação depende da prevenção de danos letais às membranas e organelas celulares durante o congelamento. A preparação dos explantes para armazenamento em nitrogênio líquido, no entanto, é bastante complexa e pode se tornar uma fonte de várias perturbações (BI et al., 2016).

Um problema comum é a dificuldade de transferência de tecnologia e validação de protocolos de um laboratório para outro. Há muitos fatores críticos envolvidos, incluindo: a qualidade e o tipo de materiais vegetais, condições de pré-tratamento e pré-cultivo, métodos de criopreservação, resfriamento, armazenamento e condições de aquecimento, e métodos de avaliação de rebrota. Além disso, são necessárias instalações adequadas e pessoal técnico qualificado (OCHATT et al., 2021).

Neste sentido, buscou-se estudar protocolos de criopreservação e técnicas de resfriamento para diferentes genótipos de amoreira-preta. Realizando ensaios para aplicação das técnicas de encapsulamento-desidratação e vitrificação de tecidos vegetais do gênero *Rubus*, ajustando os protocolos de criopreservação visando a possível implementação, junto à rotina do Laboratório de Culturas de Tecidos (LCT) da Embrapa Clima Temperado, auxiliando na manutenção, conservação e disponibilização de genitores de elevado potencial produtivo, genético e sanitário e em apoio aos programas de melhoramento genético e ao setor produtivo de amoras-pretas.

## **CAPITULO 1**

**Encapsulamento-desidratação para o cultivo in vitro de amoreira-preta**

## Introdução

Entre as espécies frutíferas de clima temperado de interesse comercial, a amoreira-preta (*Rubus* spp) se destaca pela rusticidade de produção e pela plasticidade de adaptação, sendo atualmente plantada em regiões de clima tropical no Brasil e no exterior.

A Embrapa Clima Temperado estuda a cultura da amoreira-preta desde a década de 70 e mantém o mais importante banco de germoplasma do Brasil, in situ e in vitro. O cultivo in vitro da amoreira-preta na Embrapa Clima Temperado é utilizado desde o ano de 1988, para manutenção da coleção de trabalho e clonagem dos materiais de interesse, produção de mudas para intercâmbio com outras instituições e, principalmente, buscando a limpeza virótica do material vegetal de interesse da instituição.

Várias cultivares e seleções de interesse são mantidas in vitro prontamente disponíveis ao programa de melhoramento genético da Embrapa Clima Temperado, a projetos de pesquisa e a conservação dos genótipos de interesse.

Dentre as técnicas modernas de cultivo in vitro de plantas, a criopreservação é um método de conservação genética a longo prazo, destacando-se por possibilitar a conservação de germoplasma de interesse por períodos muito longos. Apesar de exigir operador treinado e materiais específicos é uma importante ferramenta de armazenamento desenvolvida há poucas décadas, sendo amplamente utilizada em bancos de germoplasmas atuais e que vem apresentando atualizações frequentes dos métodos empregados.

As unidades encapsuláveis ou sementes sintéticas, propostas por Redenbaugh et al. (1986), consistem na formação de uma matriz de hidrogel ao redor do material propagativo utilizado. Na busca por atualizações nas técnicas de criopreservação, as unidades encapsuláveis foram mescladas com técnicas de vitrificação, assim surgindo as técnicas de encapsulamento-vitrificação, encapsulamento-desidratação e, mais recentemente, a criopreservação em crioplacas.

Para se ter um protocolo eficiente, é importante destacar que, vários fatores afetam o resultado, como a composição da cápsula, os pré-tratamentos e a composição do meio de regeneração, por exemplo. Protocolos de encapsulamento-desidratação envolvem as etapas de excisão dos meristemas ou gemas das culturas

in vitro; encapsulamento; pré-cultivo em concentrações fixas ou crescentes de sacarose; desidratação; congelamento a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; descongelamento em banho-maria ( $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) e cultivo em meio de regeneração (BETTONI et al., 2016).

A crioplaca é uma técnica que mescla o método do encapsulamento e a vitrificação a fim de fornecer maior velocidade e estabilidade às mudanças bruscas de temperatura. Considerada a mais recente otimização do método de vitrificação em gotas, as crioplacas de alumínio foram desenvolvidas com base nos métodos de vitrificação em PVS2 e desidratação ao ar, conhecidas como crioplaca 'V' (YAMAMOTO et al., 2011) e crioplaca 'D' (NIINO et al., 2013), respectivamente.

As placas de alumínio facilitam o manuseio dos explantes a serem criopreservados. No presente trabalho utilizou-se a crioplaca 'D'. Para isso, pequenas placas confeccionadas em alumínio contendo poços esféricos são utilizadas para deposição do material sobre uma gota de alginato (encapsulamento).

O experimento buscou adequar a técnica de encapsulamento-desidratação e crioplaca 'D' in vitro com o objetivo de desenvolver um protocolo eficiente para a criopreservação de amoreira-preta para a rotina do Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Clima Temperado – Pelotas/RS.

## **2 Material e Métodos**

### **2.1 Material Vegetal**

Os genótipos de 'BRS Xingu' e 'BRS Caingá' de amoreira-preta (*Rubus sp.*) utilizados para os estudos de encapsulamento foram multiplicados a partir de plantas da coleção de trabalho do gênero *Rubus* mantidos in vitro no Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Clima Temperado.

### **2.2 Cultivo e Multiplicação**

Para o cultivo e multiplicação in vitro das cultivares em estudo, foram multiplicados segmentos caulinares de plantas previamente estabelecidas e cultivadas in vitro em meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) 100%, acrescido com 0,09 mol L<sup>-1</sup> de sacarose, gelificado com 7,5 g L<sup>-1</sup> ágar e suplementado com a citocinina BAP (0,8 mg L<sup>-1</sup>). O pH do meio foi ajustado para 6,0±0,1 antes da autoclavagem a 121 °C, durante 20 minutos. Este meio de cultura de multiplicação será denominado ao longo deste trabalho de MM (meio de multiplicação) e é descrito em detalhes por Dutra et al. (2010).

Os explantes utilizados nos experimentos foram multiplicados sequencialmente sempre que havia a necessidade de maior quantidade de material propagativo. Foram excisados segmentos nodais contendo duas gemas cada e cultivados durante 30 dias, em frasco de vidro com 30 mL de meio de cultura em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 h sob irradiância de 36 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> e temperatura de 23±2 °C.

### **2.3 Criopreservação de Unidades Encapsuláveis**

Serão descritos a seguir os experimentos realizados utilizando-se as técnicas de encapsulamento-desidratação de tecidos vegetais em matriz de alginato:

Foram realizados experimentos utilizando-se material propagativo das duas cultivares mais recentemente lançadas pela Embrapa, 'BRS Xingu' e 'BRS Caingá'. Foram testados alguns fatores que podem afetar os resultados da técnica de encapsulamento e criopreservação de tecidos vegetais.

Buscou-se inicialmente avaliar a composição das cápsulas de alginato, quanto à presença de fitorregulador e carvão ativado (experimento 1); avaliou-se a necessidade de se adicionar antioxidantes na formulação da cápsula (experimento 2); em um terceiro momento, o meio de regeneração com adição de fitorreguladores em diferentes concentrações, após o encapsulamento-desidratação (experimento 3). Na sequência, a técnica da crioplaca, variando o tempo e o agente desidratante, foi o objeto do estudo (experimento 4). Posteriormente, a tolerância em relação ao tempo de exposição à solução de vitrificação PVS2 foi testada (experimento 5). Em outro momento, iniciaram-se os experimentos variando o tipo de resfriamento e o pré-condicionamento com sacarose ou DMSO, seguido do resfriamento lento ou rápido (experimento 6). No último experimento, a solução de vitrificação PVS3, que ainda não havia sido utilizada, foi comparada à solução PVS2 antes dos resfriamentos lento ou ultrarrápido (experimento 7).

### 2.3.1 Experimento 1: Composição da Cápsula – Fitorregulador e Carvão Ativado (CA)

Para o estudo da influência da citocina 6-benzilaminopurina (BAP) e do carvão ativado (CA) na matriz da cápsula, gemas laterais da amoreira 'BRS Xingu', com comprimento entre 1 e 2 mm, foram excisadas de plântulas in vitro com três semanas de cultivo (seção 2.2), inoculadas em placas de Petri descartáveis contendo 25 mL de meio MS com  $0,3 \text{ mol L}^{-1}$  de sacarose e gelificado com  $7,5 \text{ g L}^{-1}$  de ágar. O pH foi ajustado para  $6,0 \pm 0,1$  antes da autoclavagem a  $121 \text{ }^\circ\text{C}$ , durante 20 minutos. Este meio com uma maior concentração de sacarose foi denominado meio de pré-congelamento (MPC).

As placas com as gemas foram mantidas no escuro em câmara de crescimento do tipo BOD (Biochemical Oxygen Demand) ( $6 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ ) por 24 h. Decorrido este período, foram confeccionadas as cápsulas em formulação básica de alginato de sódio (AS) a 4,5% em meio MS sem cálcio, que foi denominado MS-cálcio, com formulações variadas de BAP e CA.

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema unifatorial, totalizando quatro tratamentos, com 10 repetições cada e 5 cápsulas por repetição. Assim, os tratamentos foram realizados da seguinte forma:

- T1 – Cápsula sem antioxidante;
- T2 – Cápsula + CA ( $0,5 \text{ g L}^{-1}$ );
- T3 - Cápsula + BAP ( $0,8 \text{ mg L}^{-1}$ );
- T4 – Cápsula + CA ( $0,5 \text{ g L}^{-1}$ ) + BAP ( $0,8 \text{ mg L}^{-1}$ );

Para isto, as gemas que estavam no MPC foram imersas em cada uma das soluções de alginato + meio de cultura + fitorregulador e/ou CA. Em seguida, os explantes foram resgatados individualmente e gotejados em solução de  $\text{CaCl}_2$  ( $100 \text{ mmol L}^{-1}$ ), onde permaneceram durante 20 minutos (fase de complexação das cápsulas). Transcorrido esse tempo, as cápsulas foram lavadas em água deionizada estéril por três vezes para retirar o excesso de  $\text{CaCl}_2$ .

Após a formação, as cápsulas foram imersas em solução osmoprotetora (LS1 – glicerol 18,4%; sacarose 13,7% em meio líquido MS) durante 20 minutos. Em

seguida, fez-se uma lavagem das cápsulas com a solução de criopreservação PVS2 e transferência destas para criotubo com 1 mL da mesma solução, onde permaneceram por 60 minutos, em temperatura ambiente ( $24\pm 2$  °C). Ao final desse período, fez-se a troca da solução de vitrificação de plantas, PVS2 (Plant vitrification solution) e adicionou-se a solução de recuperação (Recovery Solution - RS), deixando-se as cápsulas durante 20 minutos, em temperatura ambiente ( $24\pm 2$  °C).

Após a realização dos tratamentos, as cápsulas foram dispostas em frascos contendo meio de cultura MS adaptado (KOVALCHUK, 2010), permanecendo por sete dias no escuro com temperatura controlada de  $23\pm 2$  °C. Posteriormente, foram acondicionadas em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 h sob irradiância de  $36 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  e temperatura de  $23\pm 2$  °C.

Após 30 dias de cultivo em sala de crescimento, foram avaliados: regeneração (%) número de gemas, número de brotações e comprimento da maior brotação (cm).

### 2.3.2 Experimento 2: Composição da cápsula – Antioxidantes

Para a avaliação da composição da cápsula quanto à presença de antioxidante, foram utilizadas gemas laterais da cultivar 'BRS Xingu', com comprimento entre 1 e 2 mm, excisadas de plântulas in vitro com três semanas de cultivo (seção 2.2). Logo após a excisão, as gemas foram depositadas em placas de Petri descartáveis contendo 25 mL do meio de pré-congelamento (MPC).

Posteriormente, as placas com as gemas foram também mantidas no escuro em BOD ( $6\pm 1$  °C) por 24 h. Decorrido este período, foram confeccionadas as cápsulas com a composição básica de alginato de sódio (AS) a 4,5% em meio MS sem cálcio (MS-cálcio), com formulações contendo os agentes antioxidantes carvão ativado (CA), polivinilpirrolidona (PVP) e/ou ácido ascórbico (AA).

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema unifatorial (composição da cápsula), totalizando oito tratamentos, com cinco repetições para cada tratamento e cinco cápsulas por repetição, quais sejam:

- T1 – Cápsula sem antioxidante;
- T2 – Cápsula + CA ( $1 \text{ g L}^{-1}$ );
- T3 - Cápsula + CA ( $1 \text{ g L}^{-1}$ ) + PVP ( $1 \text{ g L}^{-1}$ );
- T4 - Cápsula + CA ( $1 \text{ g L}^{-1}$ ) + AA ( $0,5 \text{ g L}^{-1}$ );
- T5 - Cápsula + PVP ( $1 \text{ g L}^{-1}$ );
- T6 - Cápsula + PVP ( $1 \text{ g L}^{-1}$ ) + AA ( $0,5 \text{ g L}^{-1}$ );
- T7 - Cápsula + AA ( $0,5 \text{ g L}^{-1}$ );
- T8 - Cápsula + CA ( $1 \text{ g L}^{-1}$ ) + PVP ( $1 \text{ g L}^{-1}$ ) + AA ( $0,5 \text{ g L}^{-1}$ );

Após 24 h do condicionamento no MPC, as gemas foram imersas em cada uma das soluções de alginato + meio de cultura e antioxidantes, conforme o esquema acima descrito.

Em seguida, os explantes foram resgatados individualmente e gotejados em solução de  $\text{CaCl}_2$  ( $100 \text{ mmol L}^{-1}$ ), onde permaneceram durante 20 minutos para a fase de complexação da cápsula. Posteriormente procedeu-se a lavagem em água deionizada estéril por três vezes, para retirar o excesso de  $\text{CaCl}_2$ .

As cápsulas foram então depositadas em criotubos contendo a solução de carregamento LS1, onde permaneceram por 20 minutos, sendo em seguida lavadas com a solução de vitrificação PVS2 e imersas em criotubos contendo 1 mL desta, permanecendo aí por 60 minutos em temperatura ambiente ( $24\pm 2$  °C). Ao final desse período, fez-se a troca da PVS2, retirando-se e adicionando-se nova alíquota da PVS. Os criotubos foram prontamente imersos em nitrogênio líquido (NL), permanecendo nestas condições por sete dias.

Decorrido o período de criopreservação, os criotubos foram resgatados do tambor contendo nitrogênio e imediatamente imersos em banho-maria a 45 °C durante 2-3 minutos, até o completo aquecimento das cápsulas e descristalização do crioprotetor. Em seguida, removeram-se os criotubos do banho-maria, retirando-se a solução PVS2 e adicionando a solução de recuperação (RS), deixando as cápsulas em contato com esta durante 20 minutos, em temperatura ambiente ( $24\pm 2$  °C).

As cápsulas após os tratamentos foram dispostas em frascos contendo o meio de multiplicação (MM), permanecendo por sete dias no escuro com temperatura controlada de  $23\pm 2$  °C. Posteriormente, foram dispostas em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 h sob irradiância de  $36 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  e temperatura de  $23\pm 2$  °C, onde permaneceram por 30 dias. Após será avaliado a sobrevivência do material submetido ao NL.

### 2.3.3 Experimento 3: Composição do meio de regeneração

Para a avaliação do meio de regeneração quanto à presença de fitorregulador, gemas laterais da cultivar 'BRS Xingu' cultivadas em MS (seção 2.2) foram excisadas com comprimento entre 1 e 2 mm. e, logo após a excisão, depositadas em placas de Petri descartáveis, contendo 25 mL de meio de cultura MS, acrescido de  $0,3 \text{ mol L}^{-1}$  de sacarose, gelificado com  $7,5 \text{ g L}^{-1}$  ágar, com o pH ajustado para  $6,0 \pm 0,1$  antes da autoclavagem a  $121 \text{ }^\circ\text{C}$ , durante 20 minutos (MPC). Após serem distribuídos nas placas, os propágulos permaneceram em BOD ( $6 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ ), no escuro durante 24 h.

No dia seguinte, os explantes foram imersos nas soluções autoclavadas de alginato de sódio 4,5%, meio de cultura MS sem cálcio acrescido de  $0,09 \text{ mol L}^{-1}$  de sacarose (composição básica da cápsula). Em seguida, os explantes foram resgatados individualmente e gotejados com auxílio de uma pipeta de Pasteur em solução autoclavada de  $\text{CaCl}_2$  ( $100 \text{ mmol L}^{-1}$ ) por 20 minutos, para a fase de complexação. As cápsulas foram lavadas por três vezes em água deionizada estéril para a retirada do excesso de  $\text{CaCl}_2$ . Logo após, as cápsulas foram colocadas sobre papel filtro autoclavado, em frascos de vidro contendo sílica-gel, por 60 minutos, para desidratação parcial.

Posteriormente, visando simular os tratamentos de criopreservação, as cápsulas foram imersas em solução de carregamento LS1 durante 20 minutos, lavadas com a solução de vitrificação PVS2 e imersas na mesma (1 mL por criotubo) durante 50 minutos, mantidas em temperatura ambiente ( $24 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Ao final desse período, fez-se a retirada da solução PVS2 e adicionou-se a solução de recuperação (RS), deixando-se as cápsulas durante 20 minutos, em temperatura ambiente ( $24 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Após os tratamentos, as cápsulas foram dispostas em frascos contendo os tratamentos do meio de regeneração (MR), permanecendo por sete dias no escuro com temperatura controlada de  $23 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ . Os tratamentos testados quanto ao meio de regeneração foram:

- T1 – MR (Controle);
- T2 – MR + BAP (0,8 mg L<sup>-1</sup>);
- T3 – MR + BAP (1,6 mg L<sup>-1</sup>)
- T4 – MR + BAP (2,4 mg L<sup>-1</sup>)
- T5 – MR (Controle);
- T6 – MR + 2iP (0,8 mg L<sup>-1</sup>);
- T7 – MR + 2iP (1,6 mg L<sup>-1</sup>);
- T8 – MR + 2iP (2,4 mg L<sup>-1</sup>);

Após a deposição das cápsulas sobre os tratamentos do meio de regeneração, estas foram dispostas em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 h sob irradiância de 36  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  e temperatura de  $23\pm 2$  °C.

O delineamento utilizado foi em modelo inteiramente casualizado em esquema bifatorial (fitorregulador x concentração) representado pelo tipo e concentração dos fitorreguladores, totalizando oito tratamentos, com cinco repetições cada e cinco cápsulas por repetição.

As variáveis avaliadas após os 30 dias de cultivo foram porcentagem de regeneração, número gemas, número de brotações e comprimento da maior brotação (cm).

### 2.3.4 Experimento 4: Agentes desidratantes: encapsulamento-desidratação e crioplacas

Gemas laterais da cultivar 'BRS Xingu' foram excisadas com comprimento entre 1 e 2 mm; logo após a excisão, foram depositadas em placas de Petri descartáveis contendo 25 mL de meio de cultura MS, acrescido de  $0,3 \text{ mol L}^{-1}$  de sacarose, gelificado com  $7,5 \text{ g L}^{-1}$  ágar, o pH ajustado para  $6,0 \pm 0,1$  antes da autoclavagem a  $121 \text{ }^\circ\text{C}$ , durante 20 minutos (MPC). Após distribuídos nas placas, os propágulos permaneceram em BOD ( $6 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ ), no escuro durante 24 h. Decorrido esse período, os explantes foram depositados nos sulcos das crioplacas (placas de alumínio com depressões de  $\pm 2 \text{ mm}$  de profundidade) (Figura 2), imersos nas soluções autoclavadas de alginato de sódio 4,5% e meio de cultura MS sem cálcio acrescido de  $0,09 \text{ mol L}^{-1}$  de sacarose e  $0,5 \text{ g L}^{-1}$  de carvão ativado. Foi também realizado o encapsulamento simples, fora das crioplacas, para comparação.



Figura 2 – A: cápsula em crioplaca de alumínio; B: dessecação de cápsulas sobre  $\text{CaCl}_2$ ; C: dessecação de cápsulas sobre sílica-gel.  
Fonte: COPATTI, 2020.

Os tratamentos constituíram-se da variação do agente desidratante (sem desidratação,  $\text{CaCl}_2$  e sílica-gel) e do tipo de encapsulamento (crioplaca ou cápsula). Para a desidratação, as crioplacas e as cápsulas foram colocadas sobre papel filtro e introduzidos em um frasco contendo 100 g de um dos agentes desidratantes durante 0, 30, 60 ou 90 minutos. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial  $3 \times 2$ , agente desidratante e encapsulamento respectivamente, perfazendo seis tratamentos, conforme segue:

- T1 – Encapsulamento sem desidratação;
- T2 – Crioplaca sem desidratação;
- T3 – Encapsulamento Sílica-gel;
- T4 – Encapsulamento CaCl<sub>2</sub>;
- T5 – Crioplaca Sílica-gel;
- T6 – Crioplaca CaCl<sub>2</sub>.

Após os períodos de desidratação propostos, as cápsulas das crioplacas foram destacadas e inoculadas em meio de regeneração MS, com 0,09 mol L<sup>-1</sup> de sacarose, suplementado com citocinina (BAP; 0,8 mg L<sup>-1</sup>), gelificado com 7,5 g L<sup>-1</sup> ágar. O pH do meio foi ajustado para 6,0±0,1 antes da autoclavagem a 121 °C, durante 20 minutos, permanecendo por sete dias no escuro com temperatura controlada de 23±2 °C. Para as cápsulas fora da crioplaca, o procedimento de regeneração foi o mesmo.

Posteriormente, foram dispostas em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 h sob irradiância de 36 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> e temperatura de 23±2 °C. Foram utilizadas cinco repetições por tratamento, cada repetição constituída por um frasco contendo cinco cápsulas cada. As variáveis avaliadas após 30 dias de cultivo, foram porcentagem de regeneração de gemas, número de brotações e comprimento da maior brotação e umidade relativa.

### 2.3.5 Experimento 5: Tempo de exposição ao PVS2

Gemas laterais da cultivar 'BRS Caingá' foram excisadas com comprimento aproximado entre 1 e 2 mm, depositadas em placas de Petri descartáveis contendo 25 mL do meio de pré-congelamento (MPC) descrito anteriormente neste capítulo (2.3.3). Após distribuídos nas placas, os propágulos permaneceram em BOD ( $6\pm 1$  °C), no escuro durante 24 h.

Os tratamentos constituíram-se do tempo de exposição das cápsulas à solução de vitrificação PVS2 (0,4 mol L<sup>-1</sup> de sacarose, 30% de glicerol, 15% de DMSO e 15% de etileno glicol em meio contendo os sais minerais do MS, pH 5,8), em temperatura ambiente ( $24\pm 2$  °C), por diferentes períodos de exposição. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema unifatorial, tempo de exposição à solução de vitrificação, totalizando cinco tratamentos, sendo cada tratamento composto por cinco repetições e cinco cápsulas por repetição.

T1 – 0 minuto;

T2 – 30 minutos;

T3 – 60 minutos;

T4 – 90 minutos;

T5 – 120 minutos.

Decorrido o período de 24 h de pré-tratamento no MPC, os propágulos foram encapsulados em solução de alginato de sódio 4,5%, com sais do MS sem cálcio e 0,5 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado.

Após a complexação em solução autoclavada de CaCl<sub>2</sub> (100 mM), as cápsulas passaram por tríplex lavagem em água estéril. Posteriormente, foram colocadas sobre papel filtro autoclavado, em frascos de vidro contendo sílica-gel, por 60 minutos para desidratação parcial e depositadas em criotubos contendo solução de carregamento (LS1) durante 20 minutos. Decorrido esse tempo, fez-se a drenagem da solução de carregamento, lavagem das cápsulas com solução de vitrificação PVS2 e imersão das cápsulas em 1 mL de PVS2 durante os diferentes períodos, em temperatura ambiente ( $24\pm 2$  °C). Ao final de cada período fez-se a troca da solução

PVS2, adicionando-se a solução de recuperação (RS), durante 20 minutos, em temperatura ambiente ( $24\pm 2$  °C).

Após os tratamentos, as cápsulas foram dispostas em frascos contendo o meio de multiplicação (MM), composto pelos sais e vitaminas do MS, com  $0,09$  mol L<sup>-1</sup> de sacarose, suplementado com citocinina (BAP;  $0,8$  mg L<sup>-1</sup>) e gelificado com  $7,5$  g L<sup>-1</sup> ágar. O pH do meio foi ajustado para  $6,0\pm 0,1$  antes da autoclavagem a  $121$  °C, durante 20 minutos, permanecendo por sete dias no escuro sob temperatura controlada de  $23\pm 2$  °C.

Posteriormente, foram dispostas em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 h sob irradiância de  $36$   $\mu$ mol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> e temperatura de  $23\pm 2$  °C. Foram utilizadas cinco repetições por tratamento, cada repetição constituída por um frasco contendo cinco cápsulas cada. As variáveis avaliadas após os 30 dias de cultivo foram porcentagem de sobrevivência e regeneração de gemas, número de brotações, comprimento da maior brotação (cm).

### 2.3.6 Experimento 6: Pré-condicionamento com sacarose ou dimetilsulfóxido (DMSO)

Para avaliação do pré-condicionamento e da utilização ou não de resfriamento lento na criopreservação das cápsulas em solução PGD (Slow cooling cryoprotectant – 10% de polietilenoglicol (PEG-8000), 10% de glicose e 10% de DMSO em meio MS líquido), plântulas de amoreira-preta ‘BRS Caingua’ pré-cultivadas in vitro foram multiplicadas e mantidas em sala de crescimento durante 30 dias (seção 2.2). Decorrido este período, os frascos contendo as plantas em crescimento pleno foram dispostos em BOD com temperatura diurna de  $20\pm 1$  °C e noturna de  $0\pm 1$  °C, com fotoperíodo de 8 h de luz, durante 15 dias.

Após os 15 dias de aclimatação, para a aplicação do pré-condicionamento, foram excisadas gemas laterais da cultivar ‘BRS Caingua’, com comprimento aproximado entre 1 e 2 mm e acondicionadas em placas de Petri descartáveis, contendo 25 mL de meio de cultura MS, acrescido de  $0,3 \text{ mol L}^{-1}$  de sacarose ou meio MS acrescido de 5% de DMSO, gelificados com  $7,5 \text{ g L}^{-1}$  ágar e pH ajustado para  $6,0\pm 0,1$  antes da autoclavagem a 121 °C, durante 20 minutos. Distribuídos nas placas e os propágulos foram mantidos em BOD ( $6\pm 1$  °C), no escuro, durante 96 h. Posteriormente, os propágulos foram encapsulados em solução de alginato de sódio 4,5%, com sais do MS sem cálcio e  $1 \text{ g L}^{-1}$  de ácido ascórbico.

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3x2, pré-condicionamento ( $0,3 \text{ mol L}^{-1}$  sacarose ou 5% DMSO) e congelamento (lento ou ultrarrápido), totalizando seis tratamentos. Os controles após o pré-tratamento foram dispostos em sala de crescimento sem passar pelo congelamento. Cada tratamento foi composto por cinco repetições e cinco cápsulas por repetição.

Os tratamentos testados foram os seguintes:

T1 – Controle DMSO 5%, sem resfriamento;

T2 – Controle sacarose  $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ , sem resfriamento;

T3 – Pré-tratamento DMSO (96 h), resfriamento rápido (imersão em NL);

T4 – Pré-tratamento DMSO (96 h), resfriamento lento ( $1^\circ \text{ C min}^{-1}$ ), imersão em NL;

T5 – Pré-tratamento sacarose  $0,3 \text{ mol L}^{-1}$  (96 h), resfriamento rápido (imersão em NL);

T6 – Pré-tratamento sacarose  $0,3 \text{ mol L}^{-1}$  (96 h), resfriamento lento ( $1^\circ \text{ C min}^{-1}$ ), imersão em NL;

Após a complexação em solução autoclavada de  $\text{CaCl}_2$  (100 mM) as cápsulas passaram por tríplice lavagem em água deionizada estéril foram colocadas sobre papel filtro autoclavado em frascos de vidro contendo sílica-gel, por 60 minutos, para desidratação parcial, e depositadas em criotubos.

Para os tratamentos de criopreservação (todos, exceto os controles T1 e T2), as cápsulas foram submetidas a solução de carregamento LS1 durante 20 minutos e após drenagem e lavagem das cápsulas com solução de vitrificação PGD e imersão em 1 mL de PGD, durante 60 minutos, foram mantidas em temperatura ambiente ( $24 \pm 2^\circ \text{ C}$ ). Ao final desse período fez-se a troca da solução PGD, adicionando-se uma nova alíquota e os criotubos foram então imersos em NL por sete dias ou dispostos em recipiente crioprotetor (NALGENE® MR. FROSTY® CRYO  $-1^\circ \text{ C FREEZING CONTAINERS}$ )<sup>2</sup> durante 60 minutos ou até a temperatura dos materiais baixar a  $-20^\circ \text{ C}$ , momento em que os criotubos foram imersos em NL.

Decorridos os sete dias de criopreservação em NL, o material foi resgatado, passando pelo processo de descongelamento em banho-maria, com água aquecida a  $45^\circ \text{ C}$  durante 2-3 minutos até o completo aquecimento das cápsulas e descristalização do crioprotetor. Em seguida, removeram-se os criotubos do banho-maria, retirou-se a solução de PGD e adicionou-se a solução de recuperação composta pelos sais do meio MS acrescido de sacarose  $0,09 \text{ mol L}^{-1}$  e  $1 \text{ g L}^{-1}$  de ácido ascórbico, deixando-se as cápsulas em contato com esta durante 20 minutos, à temperatura ambiente ( $24 \pm 2^\circ \text{ C}$ ). Após o descongelamento, as cápsulas foram dispostas em frascos contendo meio de cultura MS, com  $0,09 \text{ mol L}^{-1}$  de sacarose, suplementado com citocinina (BAP;  $0,8 \text{ mg L}^{-1}$ ), gelificado com  $7,5 \text{ g L}^{-1}$  ágar. O pH do meio foi ajustado para  $6,0 \pm 0,1$  antes da autoclavagem a  $121^\circ \text{ C}$ , durante 20 minutos, permanecendo por sete dias no escuro com temperatura controlada de  $23 \pm 2^\circ \text{ C}$ .

---

<sup>2</sup> O sistema deriva de um simples recipiente de congelamento, com capacidade para 12 a 18 criotubos de 1 a 5 mL, projetado para atingir uma taxa de resfriamento aproximada de  $-1^\circ \text{ C minutos}^{-1}$ . Isso decorre da adição de isopropanol, substância tal que possui um calor específico que permite este decréscimo controlado da temperatura. O isopropanol não entra em contato direto com os criotubos e, assim, o sistema Mr. Frosty® requer apenas um freezer mecânico.

Posteriormente, as capsulas contendo os explantes, foram dispostas em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 h, sob irradiância de  $36 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  e temperatura de  $23\pm 2$  °C. As variáveis a serem avaliadas após os 30 dias de cultivo foram porcentagem de sobrevivência e regeneração de gemas, número de brotações e comprimento da maior brotação (cm).

### 2.3.7 Experimento 7: Teste de PVS 2 e PVS3 e Resfriamento Lento e rápido

Neste experimento, foram testadas as soluções crioprotetoras PVS2 e PVS3 (Glicerol 50%; Sacarose 50%) e o tipo de resfriamento (lento ou rápido). Para isso, plantas de amoreira-preta 'BRS Xingu' pré-estabelecidas in vitro foram multiplicadas e mantidas em sala de crescimento durante 30 dias (seção 2.2). Posteriormente, os frascos foram transferidos para pré-condicionamento em BOD com temperatura diurna de  $20 \pm 1$  °C, com fotoperíodo de 8 h e temperatura noturna de  $0 \pm 1$  °C, durante 15 dias.

Decorrido o período de pré-condicionamento, para a aplicação do pré-congelamento, gemas laterais da cultivar 'BRS Xingu', foram excisadas com comprimento entre 1 e 2 mm, depositadas em placas de Petri descartáveis contendo 25 mL de MPC, composto por meio de cultura MS, acrescido de  $0,3 \text{ mol L}^{-1}$  de sacarose, gelificado com  $7,5 \text{ g L}^{-1}$  ágar, com pH ajustado para  $6,0 \pm 0,1$  antes da autoclavagem a 121 °C, durante 20 minutos. Após distribuídos nas placas, os propágulos permaneceram em BOD ( $6 \pm 1$  °C), no escuro durante 24 h. Os propágulos foram então encapsulados em solução de alginato de sódio 4,5%, com sais do MS sem cálcio e  $0,5 \text{ g L}^{-1}$  de carvão ativado.

Após a complexação em solução autoclavada de  $\text{CaCl}_2$  ( $100 \text{ mmol L}^{-1}$ ), as cápsulas passaram por tríplice lavagem em água deionizada estéril, foram colocadas sobre papel filtro autoclavado, em frascos de vidro contendo 100 g de sílica-gel, por 60 minutos (para desidratação parcial) e depositadas em criotubos.

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x3, solução de vitrificação (PVS2 ou PVS3) e resfriamento (sem resfriamento, resfriamento lento ou ultrarrápido), totalizando seis tratamentos, e mais dois controles (sem solução PVS e sem solução PVS, imersão em NL), que após o tratamento foram dispostos em sala de crescimento. Cada tratamento foi composto por cinco repetições e cinco capsulas por repetição.

Para os tratamentos de criopreservação, foi incluída nos criotubos 1mL da solução de carregamento (LS1) durante 20 minutos, com posterior drenagem e lavagem das cápsulas com solução de vitrificação (PVS2 ou PVS3) condizentes com cada tratamento, que foram assim distribuídos:

- T1 – Controle (sem PVS e sem resfriamento);
- T2 – Controle (sem PVS, resfriamento rápido -NL);
- T3 – PVS2, sem resfriamento;
- T4 – PVS2, resfriamento rápido (imersão em NL);
- T5 – PVS2, resfriamento lento ( $1^{\circ} \text{C min}^{-1}$ ), imersão em NL;
- T6 – PVS3, sem resfriamento;
- T7 – PVS3, NL;
- T8 – PVS3, resfriamento lento ( $1^{\circ} \text{C min}^{-1}$ ), imersão em NL.

Em seguida, as cápsulas foram imersas em 1 mL de PVS2 (T3 – T5) ou PVS3 (T6 – T8), durante 60 minutos, mantendo-se os tratamentos à temperatura ambiente ( $24 \pm 2^{\circ} \text{C}$ ). Ao final desse período, fez-se a troca da solução (retirando-se e adicionando-se uma nova alíquota). Na sequência, os criotubos foram imediatamente imersos em NL (resfriamento rápido) onde permaneceram por sete dias, ou dispostos em recipiente crioprotetor para resfriamento lento (NALGENE® MR. FROSTY® CRYO  $-1^{\circ} \text{C FREEZING CONTAINERS}$ ) durante 60 minutos, ou até a temperatura dos materiais baixar a  $-20^{\circ} \text{C}$ , momento em que os criotubos foram imersos em NL.

Decorridos os sete dias de criopreservação o material foi resgatado do NL, passando então pelo processo de descongelamento em banho-maria com água aquecida a  $45^{\circ} \text{C}$  durante 2-3 minutos até o completo aquecimento das cápsulas e descristalização do crioprotetor. Em seguida, os criotubos foram removidos do banho-maria, retirando-se a PVS e adicionando-se a solução de recuperação (Recovery Solution – RS), deixando-se as cápsulas em contato com esta durante 20 minutos, em temperatura ambiente ( $24 \pm 2^{\circ} \text{C}$ ). Após o descongelamento, as cápsulas foram dispostas em frascos contendo meio de cultura MS, com  $0,09 \text{ mol L}^{-1}$  de sacarose, suplementado com citocinina (BAP;  $0,8 \text{ mg L}^{-1}$ ), gelificado com  $7,5 \text{ g L}^{-1}$  ágar. O pH do meio foi ajustado para  $6,0 \pm 1$  antes da autoclavagem a  $121^{\circ} \text{C}$ , durante 20 minutos, permanecendo por sete dias no escuro com temperatura controlada de  $23 \pm 2^{\circ} \text{C}$ .

Posteriormente, foram dispostas em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 h sob irradiância de  $36 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  e temperatura de  $23 \pm 2^{\circ} \text{C}$ .

Após sete dias no escuro e 30 dias de cultivo, foi avaliada a capacidade de regeneração dos explantes expostos às PVSs e ao resfriamento lento ou ultrarrápido.

## 2.4 Análises estatísticas

Os experimentos foram conduzidos adotando-se o delineamento inteiramente ao acaso. Os dados foram analisados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro Wilk; à homocedasticidade pelo teste de Hartley; e à independência dos resíduos por análise gráfica. Posteriormente, os dados foram submetidos à análise de variância através do teste F ( $p \leq 0,05$ ).

Constatando-se significância estatística, as médias foram comparadas, por testes de probabilidade para as variáveis qualitativas, de acordo com a necessidade apresentada pelos dados de cada experimento.

### 3 Resultados e Discussão

Os resultados dos sete experimentos realizados com as técnicas de encapsulamento-desidratação de tecidos vegetais em matriz de alginato de cálcio serão descritos a seguir, conforme a ordem apresentada na seção anterior:

#### 3.1 Experimento 1: Composição da cápsula – fitorregulador e carvão ativado

Quanto à composição da cápsula utilizando o fitorregulador BAP e/ou carvão ativado, não foram verificadas diferenças para as variáveis porcentagem de regeneração ( $F=0,03$ ;  $p<0,993$ ), número de gemas ( $F=1,38$ ;  $p<0,2955$ ) e de brotações ( $F=1,52$ ;  $p<0,2589$ ).

Para a amoreira-preta, a presença de BAP na matriz de alginato apresentou efeito ligeiramente negativo. Apesar de a utilização de citocinina ser essencial à multiplicação da parte aérea in vitro, a adição na cápsula pode ter dificultado o desenvolvimento dos explantes.

O comprimento das brotações foi influenciado, com maior média nos tratamentos MS (T1), MS+CA (T3) e MS+BAP+CA (T4). A adição de CA na matriz de encapsulamento apresentou diferença nas médias de comprimento de brotação apenas em comparação com a formulação MS+BAP na composição das cápsulas de alginato (Tabela 4).

Tabela 4 – Regeneração, número de gemas, número de brotações e comprimento da maior brotação de explantes de amoreira-preta 'BRS XINGU', submetidas a diferentes formulações de cápsula de alginato de sódio, na presença ou ausência de fitorregulador BAP e/ou carvão ativado (EMBRAPA Clima Temperado, Pelotas, RS, Brasil, 2021).

Tratamento	Regeneração	Número de gemas	Número de brotações	Comprimento das brotações (cm)
MS	0,93 <sup>NS</sup>	6,93 <sup>NS</sup>	2,24 <sup>NS</sup>	0,30 ab <sup>1/</sup>
MS+BAP	0,90	5,83	2,02	0,23 b
MS+CA	0,95	7,76	2,00	0,37 a
MS+BAP+CA	0,90	6,06	1,84	0,32 ab

<sup>1/</sup> Médias (de cinco repetições) acompanhadas por mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p\leq 0,05$ ) comparando as formulações de cápsulas de alginato de cálcio.

A adição de CA à cápsula não apresentou efeitos; entretanto, o CA adicionado ao meio de regeneração pode trazer benefícios ao material vegetal. De acordo com Pereira et al. (2008), ao trabalhar com concentrações de sais do meio MS e carvão ativado na matriz de encapsulamento, não foram observadas diferenças significativas na altura de plântulas de pimenta-longa (*Piper hispidinervum* C.).

Em pequenas concentrações, o CA proporciona efeitos antioxidantes pela adsorção de componentes prejudiciais ao crescimento do material vegetal, como citocininas e/ou giberelinas residuais e componentes tóxicos liberados pelos tecidos, além de poder reter aglomerados de nutrientes, liberando-os gradativamente, favorecendo a cultura (SAIPRASAD, 2001; ALOUFA, 2003).

Mesmo sem apresentar diferença estatística das demais formulações, a cápsula somente contendo meio MS possibilitou bons resultados para as variáveis analisadas; assim, pode-se inferir que a adição de CA pode ser opcional enquanto BAP não se faz necessário na formulação da matriz da cápsula de alginato de cálcio para o encapsulamento de explantes de amoreira-preta. Na Figura 3 são mostradas as plantas recuperadas a partir das cápsulas após 30 dias de cultivo.

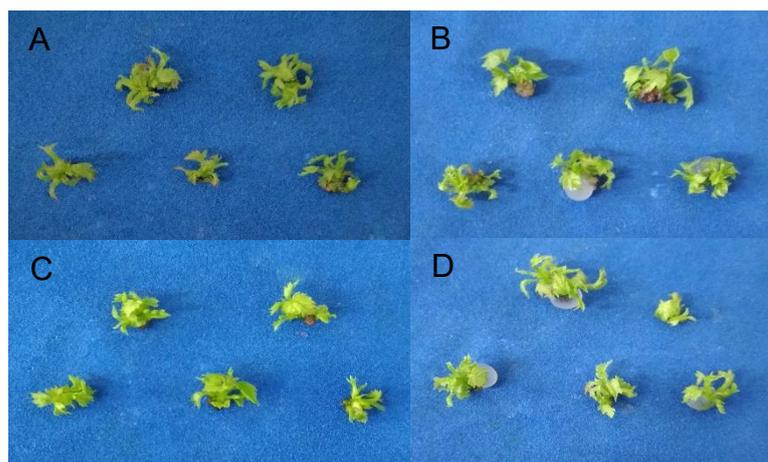


Figura 3 – Explantes de amoreira-preta 'BRS Xingu' recuperados de explantes envolvidos em matriz de alginato de cálcio (A -T1 – Cápsula sem antioxidante; B -T2 – Cápsula + CA (0,5 g L<sup>-1</sup>); C -T3 - Cápsula + BAP (0,8 mg L<sup>-1</sup>); D -T4 – Cápsula + CA (0,5 g L<sup>-1</sup>) + BAP (0,8 mg L<sup>-1</sup>); após 30 dias de cultivo em sala de crescimento.

Fonte: COPATTI, 2020.

### 3.2 Experimento 2: Composição da cápsula – antioxidantes

Não houve diferença estatística pelo teste F ( $F = 1,13$ ;  $p < 0,3722$ ) para a regeneração dos explantes de 'BRS Xingu' encapsulados em matriz de alginato de cálcio e os antioxidantes empregados em sua composição.

Os tratamentos propostos apresentaram baixa viabilidade de regeneração do material vegetal de 'BRS Xingu' quando expostos ao NL, ocorrendo o máximo de 12% de sobrevivência (calos e plantas) quando a cápsula foi acrescida com ácido ascórbico em sua composição (T7 – Figura 4G). As cápsulas acrescidas com CA (T2 – Figura 4B), CA+PVP (T3 – Figura 4C) e PVP (T5 Figura 4E) apresentaram 8% de sobrevivência, porém ocorreu apenas a formação de calos friáveis.

O controle T1 (AS 4,5% sem antioxidante – Figura 4A), por sua vez, e a combinação de todos os antioxidantes – T8 (CA+AA+PVP – Figura 4H) apresentaram 4% de regeneração, enquanto que a combinação de CA+AA e PVP+AA (T4 e T6 – Figura 4D e 4F) não apresentaram êxito na regeneração de germoplasma de 'BRS Xingu' submetidos à criopreservação.

A proteção antioxidante compreende vias fisiológicas altamente complexas e integradas, fundamentais para a regulação de eventos de sinalização celular e metabólicos e para o incremento na respiração (TAIZ; ZEIGER, 2017). A adição de antioxidantes às cápsulas buscou aumentar a tolerância aos principais efeitos deletérios que podem ocorrer. A inclusão de antioxidantes na matriz de alginato pode apresentar vantagens aos protocolos de criopreservação de amoreiras-preta. Uchendu et al. (2010) testaram a adição de ácido lipóico (LA), glutathiona (GSH), glicina betaína (GB) e polivinilpirrolidona (PVP) em pré-condicionamento, carregamento, recuperação e regeneração de duas cultivares de amoreira-preta utilizando o protocolo de vitrificação com PVS2. Três dos quatro compostos apresentaram efeitos benéficos aos explantes, obtendo-se mais de 80% de regeneração com LA (4-8 mmol L<sup>-1</sup>), GSH (0,16 mmol L<sup>-1</sup>) e GB (10 mmol L<sup>-1</sup>); já o PVP teve um impacto neutro ou negativo na rebrota. Isto corrobora com os dados obtidos no experimento 2, onde apenas 4% de sobrevivência foi verificada quando se adicionou PVP às cápsulas de alginato de cálcio.

Os protocolos de criopreservação aumentam a oxidação celular pelos efeitos osmóticos e químicos que os vários tratamentos conferem aos tecidos vegetais. A adição e o tipo de antioxidante variam em culturas e métodos de criopreservação. A utilização dos solutos e procedimentos corretos pode diminuir os efeitos negativos da desidratação e oxidação, aumentando a capacidade de regeneração dos explantes criopreservados (UCHENDU et al. 2010; MATHEW et al. 2018; VOLK et al. 2018). Desse modo, a presença de antioxidantes pode melhorar o crescimento, prevenindo ou reparando os danos causados aos tecidos vegetais pelos procedimentos crioprotetores.

Possivelmente a falta de adaptação (pré-condicionamento) ao resfriamento fez com que ocorresse a elevada taxa de mortalidade. Apesar da importância dos antioxidantes para as plantas, a tolerância ao resfriamento em plantas de clima temperado é conferida pela exposição gradativa a baixas temperaturas, que na natureza é induzida no início do outono pela exposição a dias curtos e temperaturas de resfriamento não congelantes.

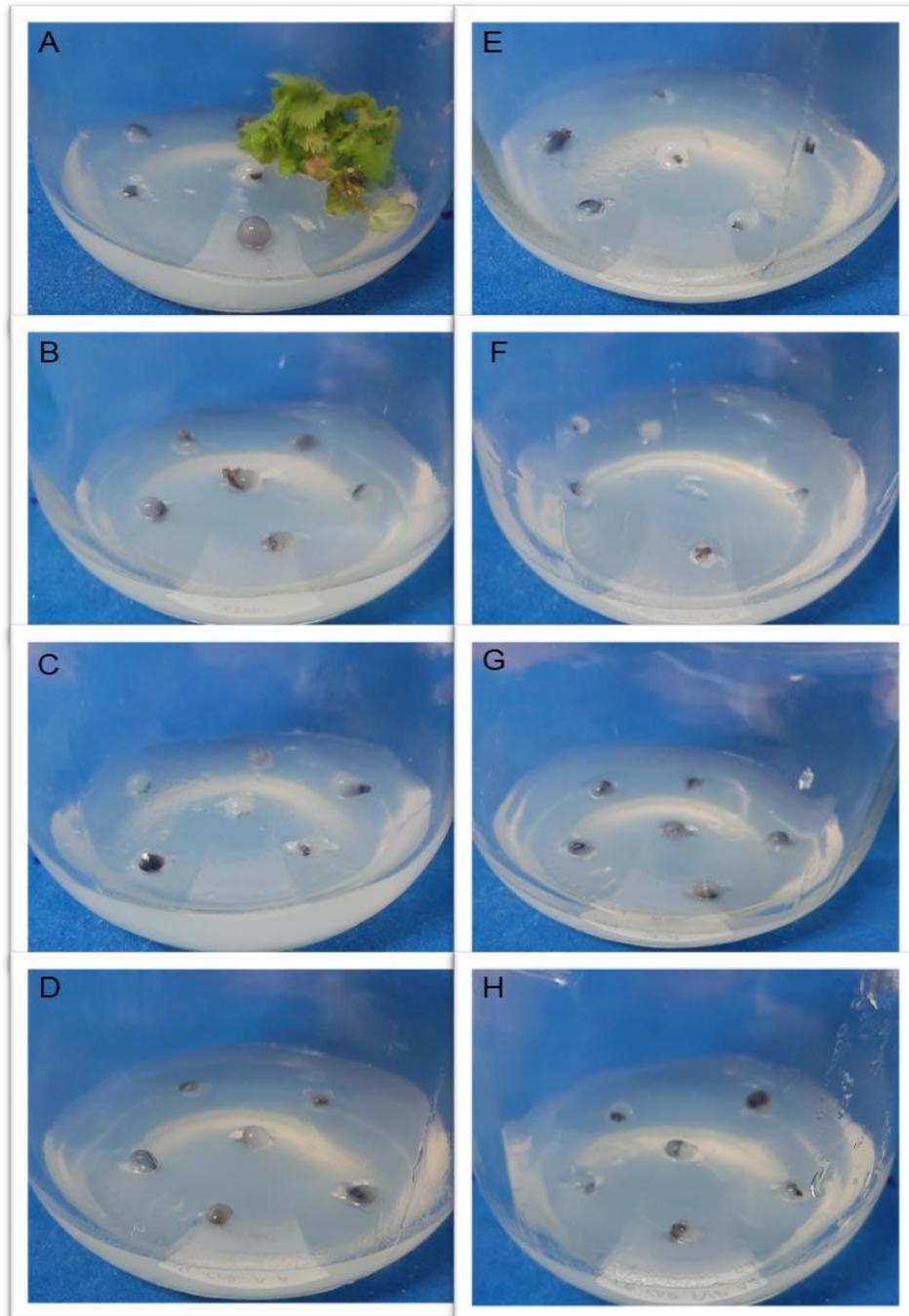


Figura 4 - Avaliação da sobrevivência de explantes de amoreira-preta “BRS Xingu” encapsuladas em diferentes antioxidantes e submetidas a imersão em NL (A -T1 – Cápsula sem antioxidante; B -T2 – Cápsula + CA ( $1 \text{ g L}^{-1}$ ); C -T3 - Cápsula + CA ( $1 \text{ g L}^{-1}$ ) + PVP ( $1 \text{ g L}^{-1}$ ); D -T4 - Cápsula + CA ( $1 \text{ g L}^{-1}$ ) + AA ( $0,5 \text{ g L}^{-1}$ ); E -T5 - Cápsula + PVP ( $1 \text{ g L}^{-1}$ ); F -T6 - Cápsula + PVP ( $1 \text{ g L}^{-1}$ ) + AA ( $0,5 \text{ g L}^{-1}$ ); G -T7 - Cápsula + AA ( $0,5 \text{ g L}^{-1}$ ); H -T8 - Cápsula + CA ( $1 \text{ g L}^{-1}$ ) + PVP ( $1 \text{ g L}^{-1}$ ) + AA ( $0,5 \text{ g L}^{-1}$ ));  
Fonte: COPATTI, 2020.

### 3.3 Experimento 3: Composição do meio de regeneração

Quanto à composição do meio de regeneração com BAP ou 2iP, não se observou diferença estatística na porcentagem de regeneração ( $F=0,56$ ;  $p<0,692$ ) de encapsulados de 'BRS Xingu'. Ocorreu interação entre os fatores fitorregulador e concentração nas variáveis: número de gemas ( $F=10,68$ ;  $p<0,0002$ ), número de brotações ( $F=12,47$ ;  $p<0,0001$ ) e comprimento da maior brotação ( $F=5,89$ ;  $p<0,0041$ ) (Figura 5). A adição de BAP proporcionou maior eficiência na multiplicação (gemas e brotações), independentemente da concentração empregada.

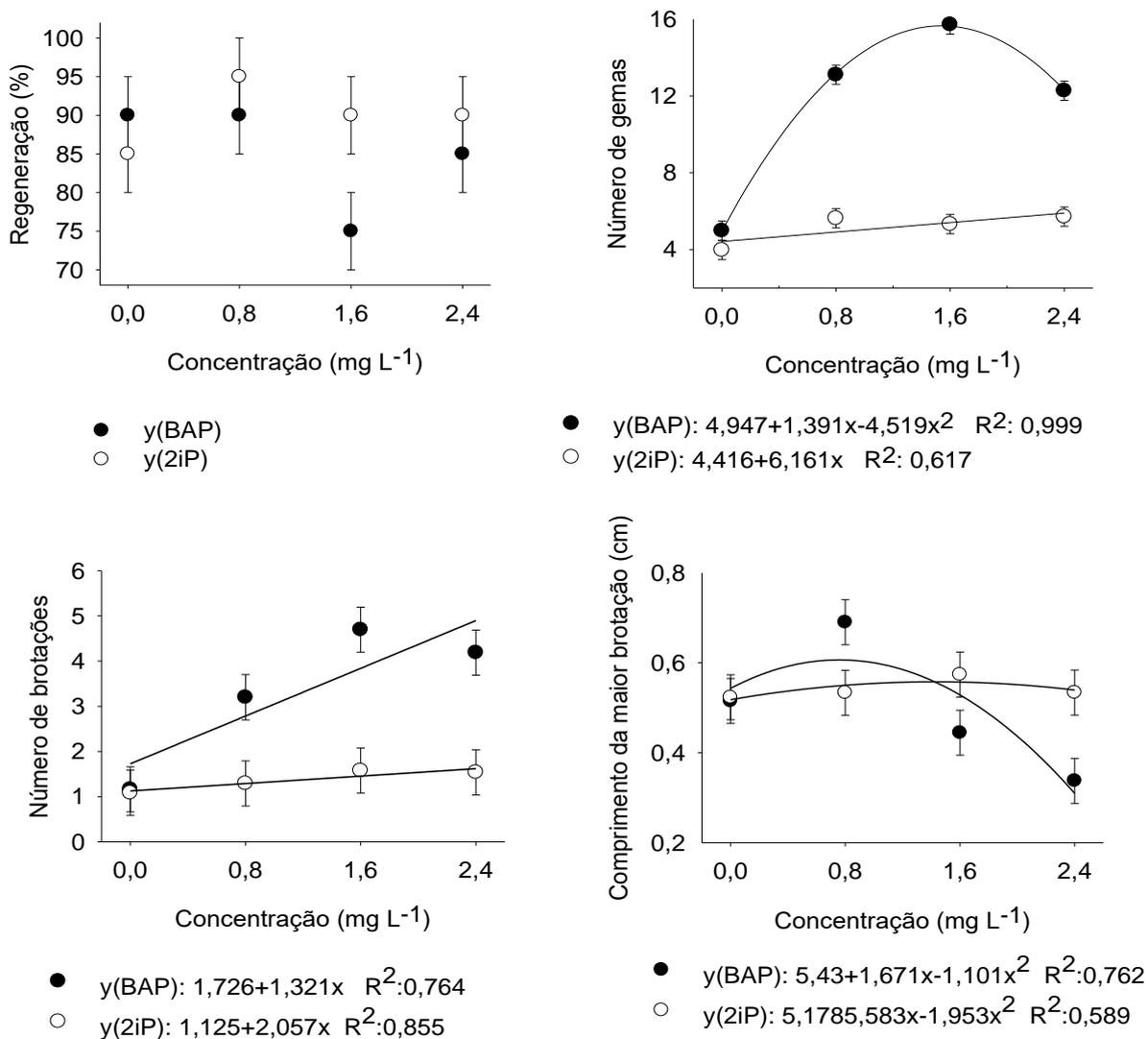


Figura 5 – Regeneração (%), número de gemas, número de brotações e comprimento da maior brotação (cm) em plântulas de amoreira-preta “BRS Xingu”, encapsuladas em alginato de cálcio (4,5%), dispostas em meio de cultura MS acrescidos de concentrações de citocininas BAP ou 2iP. Embrapa Clima Temperado, 2020. (As barras verticais representam o intervalo de confiança a 95%).

A análise de regressão para as concentrações de BAP indicou o aumento da produção de gemas e de brotações quando o meio de regeneração foi suplementado com até  $1,6 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP, sendo o número de gemas e brotações estimados em 15,79 e 4,69 respectivamente. Para a amoreira-preta 'BRS Xingu', a concentração de  $5 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  de BAP foi efetiva, apresentando também o aumento no número das brotações entre os sucessivos subcultivos (SCHIEHLA; FRANÇA; BIASI, 2019). Com o aumento da concentração de BAP ( $2,4 \text{ mg L}^{-1}$ ), no entanto, o número de gemas apresentou tendência decrescente pois, possivelmente, a partir dessa concentração o excesso de citocinina no meio de regeneração passou a causar toxidez nos tecidos vegetais (Figura 5).

O uso de reguladores de crescimento em meios de regeneração, mesmo quando utilizado em pequenas concentrações, tem-se mostrado fundamental. Na etapa de multiplicação, por exemplo, um estudo de Oliveira e Nino (2007), com sete cultivares de amoreira-preta (Brazos, Cherokee, 'Comanche', Ébano, Guarani, 'Tupy' e Xavante), foram obtidas diferentes resultados de acordo com a cultivar, sendo que o número estimado de plantas produzidas após 6 subcultivos foi 16.335 para 'Brazos', 24.211 para 'Cherokee', 19.778 para "Comanche", 106.550 para 'Ébano', 14.275 para 'Guarani', 34.022 para "Tupy" e 24.651 para 'Xavante'.

Na intenção de se aumentar o número de brotações na cultivar Chester Thornless, os autores Kefayeti, Kafkas e Ercisl (2019) propuseram a adição de  $8,8 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  BAP (6-benzilaminopurina) +  $0,9 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  AIB (ácido indolbutírico) ao meio de cultura. Enquanto para a cultivar Ébano apenas  $4,4 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  de BAP e meio MS (acrescido com sais em mais 50%) são necessários para se aumentar a produção de brotações (VILLA et al., 2005), para 'Xavante' a maior taxa de brotação foi alcançada em meio MS suplementado com  $15 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  de BAP (LEITZKE; DAMIANI; SCHUCH, 2010).

A adição de BAP influenciou o comprimento da maior brotação, sendo que o uso de  $1,6 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP proporcionou resultados menos expressivos do que a adição de  $0,8 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP, após 30 dias de cultivo, os explantes apresentavam brotações com média de 0,69 cm. Pasqual (2001) cita que altas taxas de citocininas podem reduzir o tamanho das brotações, estimular a ocorrência de hiperidricidade e formação de folhas anormais.

Nos tratamentos com adição de 2iP, o comportamento do explantes de 'BRS Xingu' demonstrou ser pouco influenciado por esse regulador, pois mesmo a maior

concentração empregada não apresentou diferença significativa do tratamento sem adição de citocinina. Uma possível explicação é o fato de os tecidos de plantas de amoreira-preta possuírem a enzima citocinina oxidase, a qual cliva a cadeia lateral do 2iP, inativando a citocinina irreversivelmente, diferentemente do BAP, o qual por ser uma citocinina aromática é resistente à clivagem (TAIZ et al., 2017).

Muito embora o uso de citocininas no meio contribui para a multiplicação, concentrações elevadas de BAP podem ser tóxicas, resultando, entre outros efeitos, na redução do tamanho das folhas, encurtamento dos entrenós e ocasionalmente em variação somaclonal (LESHEN et al., 1988; COSTA et al., 2006). Quando esses reguladores de crescimento são utilizados em concentrações inadequadas, podem estimular o desenvolvimento de calos (WANG et al., 2000; LAMBARDI; FABBRI; CACCAVALE, 2000). As técnicas de calogênese são úteis para induzir variação somaclonal e desenvolvimento de novos genótipos, mas as culturas de calos não são adequadas para a preservação de genótipos.

A capacidade de regeneração das culturas por meio de crescimento direto de estrutura diferenciada, sem o desenvolvimento de calo, é fundamental para evitar problemas de variação somaclonal, principalmente quando se utilizam estruturas diferenciadas como fonte de explante (MATSUMOTO, 2017; CHAROENSUB; HIRAI; SAKAI, 2004; HARDING, 2004).

Para a micropropagação geral de 'BRS Xingu', faz-se necessária a adição de uma citocinina ao meio de cultura. Pelo presente trabalho, pode-se inferir que a concentração pode variar de 0,8 a 1,6 mg L<sup>-1</sup> de BAP, a depender do objetivo que se almeja. A concentração de BAP de 0,8 mg L<sup>-1</sup> é também a utilizada no protocolo de multiplicação de amoreira-preta do LCT-Embrapa, proposto por Dutra et al. (2010).

De qualquer maneira, sendo esse experimento realizado visando a regeneração pós criopreservação, mais estudos devem ser realizados a fim de evidenciar como o material já estressado pelos tratamentos pré-criopreservação, imersão em NL e pós-criopreservação se comportarão quando expostos ao meio de regeneração com citocinina na sua formulação.

### 3.4 Experimento 4: Agentes desidratantes: encapsulamento-desidratação e crioplacas

As variáveis número de gemas e número de brotações apresentaram comportamento similar para a desidratação de cápsulas de 'BRS Xingu' livres ou em placas, tendo o tratamento de encapsulamento em crioplaca desidratadas em  $\text{CaCl}_2$  apresentado valores de 51,8 e 13,8, respectivamente com 90 minutos de desidratação (Figura 6).

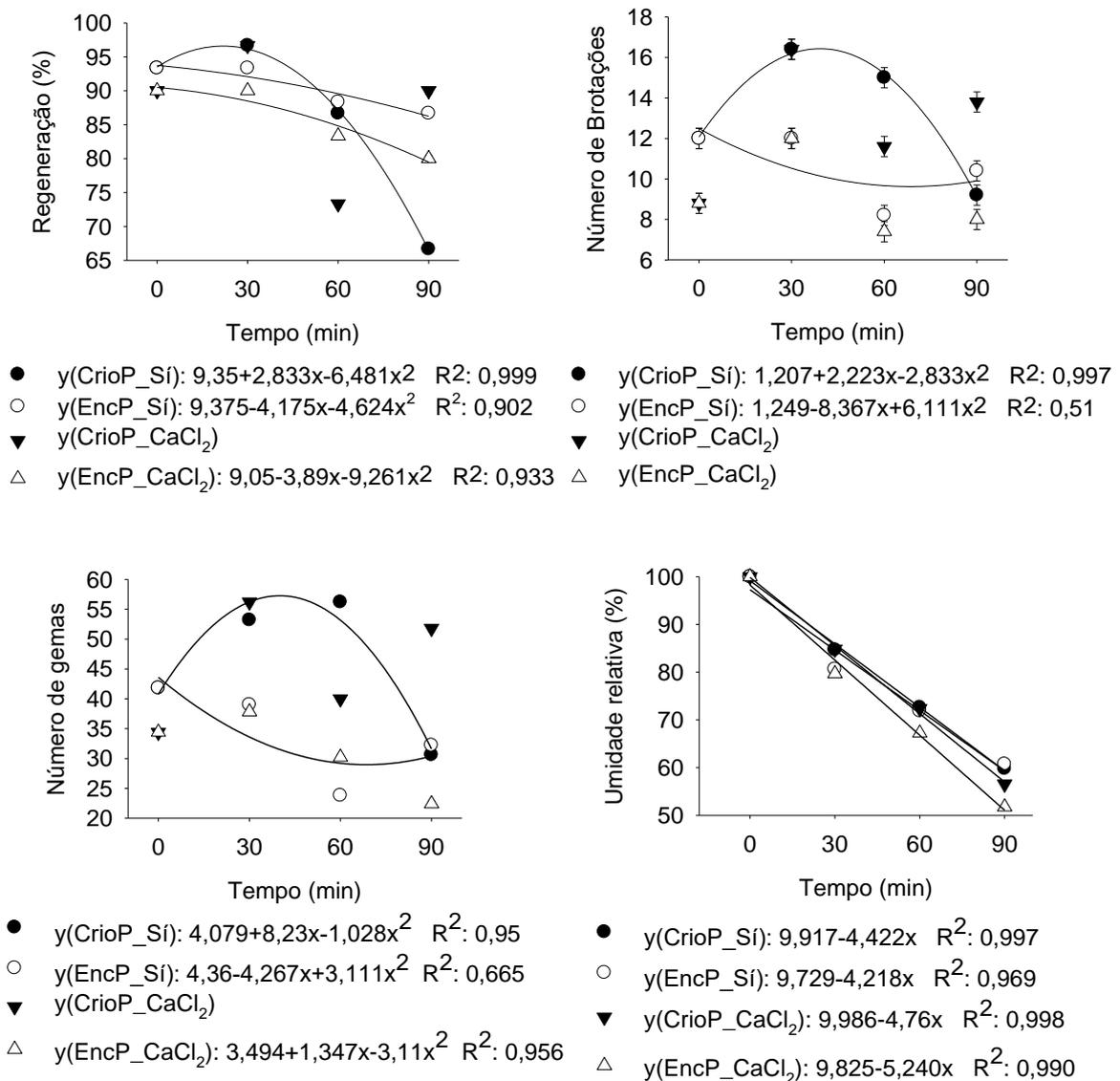


Figure 6 -Regeneração (%), número de brotações, número de gemas e umidade relativa de gemas de amoreira-preta 'BRS Xingu' desidratada em sílica-gel ou cloreto de cálcio, ao longo do tempo. Embrapa Clima Temperado, 2020. (As barras verticais representam o intervalo de confiança a 95%).

Entretanto, mesmo após 90 minutos de desidratação, todos os tratamentos apresentavam teores de umidade médios em torno de 57%. Sendo assim, a formação de cristais de gelo intracelular poderá ocorrer com facilidade, visto que, para se obter bons resultados de recuperação pós criopreservação, preconiza-se a remoção total ou parcial da água passível de congelamento.

Neste experimento, buscou-se uma alternativa prática à dessecação em corrente de ar; assim, abriu-se a possibilidade de se utilizar sílica-gel ou cloreto de cálcio. Os resultados obtidos demonstraram que tanto a sílica-gel quanto o cloreto de cálcio podem ser empregados com relativa facilidade, sendo que nos períodos empregados não houve diferenças nos níveis de dessecação; porém, os explantes apresentaram diferenças no percentual de sobrevivência. Esses dados mostram-se relevantes pois, mesmo antes da exposição ao ACP, ao NL e à recuperação, já há perdas de explantes.

Em geral, após o pré-condicionamento por horas ou até dias, realiza-se a dessecação ao ar em uma câmara de fluxo laminar, sílica-gel ou cloreto de cálcio, até que se alcance teores de umidade de cerca de 20% (peso fresco) antes do armazenamento em NL (BENELLI et al. 2013; FENG et al., 2014).

A depender do tipo de explante, a dessecação deve alcançar níveis abaixo de 30% do teor de umidade inicial, beneficiando a resistência ao congelamento e à sobrevivência pós-criopreservação para a maioria das espécies. A redução gradual do teor de umidade de 40 para 25% aumenta a resistência ao congelamento no pessegueiro e promove aumento dos valores nas principais variáveis analisadas (folhas, brotos e entumescimento) (TANNER et al., 2021).

Ao analisar os tempos de desidratação em sílica-gel, pode-se observar que o aumento do tempo de desidratação reduziu a porcentagem de regeneração de forma mais drástica quando os materiais vegetais foram encapsulados utilizando a técnica da crioplaca (66,65%), enquanto os outros tratamentos mantiveram níveis de regeneração após a desidratação acima de 80%, chegando a 90% quando se utilizou  $\text{CaCl}_2$  como desidratante durante 90 minutos (Figura 6). Para a dessecação de minitubérculos de batata, Wang et al. (2021) relataram a necessidade de expor o material vegetal durante três horas à sílica-gel para reduzir o teor de água para 26-36% da massa inicial, antes da imersão direta em NL, permitindo a regeneração de 100% dos explantes.

O período de dessecação deve estar de acordo com o nível de umidade que se deseja atingir. Ao se realizar a dessecação das cápsulas e crioplaças, não se chegou a níveis menores que 50% de umidade das cápsulas nos períodos em estudo. Esses níveis de umidade são possivelmente um impeditivo ao sucesso dos protocolos, pois a extensão dos danos que o resfriamento causará aos tecidos vegetais está intimamente ligada ao teor de umidade do conjunto cápsula/explante antes da imersão em NL (CARRA et al., 2019; BI et al., 2017), devido à necessidade de se atingir o estado vítreo amorfo sem que ocorra a formação de cristais de gelo no interior dos tecidos vegetais.

Em células desidratadas, a capacidade de formação de gelo é menor; a saída da água do interior das células ocorre pelos efeitos hipertônicos, ocasionando a migração da água do vacúolo em direção ao meio hipertônico, causando a desidratação celular e redução do turgor, concentrando os íons e conferindo assim proteção contra o congelamento. A excessiva desidratação, todavia, pode causar efeitos citotóxicos pela redução do potencial hídrico do apoplasto mais negativo que o do simplasto (TAIZ et al.; 2017).

Além do estado fisiológico, das características dos explantes como tamanho e teor de água dos tecidos a serem criopreservados, a taxa de resfriamento também pode influenciar diretamente nos resultados alcançados. Para se alcançar uma maior capacidade de resfriamento dos explantes, utilizou-se a capacidade de troca térmica do alumínio, onde altas taxas de resfriamento podem ser alcançadas. As crioplaças deste material são eficazes em diversos gêneros, devido principalmente à troca ultrarrápida de temperatura, cerca de 3000-5000 °C min<sup>-1</sup>, um requisito importante para protocolos de criopreservação bem-sucedidos (NIINO et al. 2019; MATSUMOTO, 2017; SOUZA et al., 2016; YAMAMOTO et al., 2011).

A técnica da crioplaça surge como uma alternativa aos protocolos de vitrificação e encapsulamento-desidratação. Todo o procedimento é realizado com o material fixado à placa de alumínio, facilitando o manuseio dos explantes e minimizando os danos mecânicos. Ao mesmo tempo, permite que a velocidade de aquecimento e resfriamento sejam elevadas (3000-5000 °C min<sup>-1</sup>), colocando-se pequenos volumes de solução crioprotetora em folhas de alumínio (1 µL por explante) ou em crioplaças de alumínio com depressões onde os explantes são depositados sobre uma gota de alginato de cálcio, sendo então realizados os procedimentos de carregamento em

solução LS e dessecação em PVS2 ou em fluxo laminar (SOUZA et al., 2016; YAMAMOTO et al., 2011; PANIS et al., 2005).

Técnicas baseadas em encapsulamento desidratação se valem de dessecação física para atingir o nível ideal ou próximo ao ideal de umidade nos tecidos vegetais encapsulados. Porém, isso pode ser difícil de ser atingido devido às variações nas condições físicas do ambiente (umidade, temperatura, taxa de fluxo de ar etc.) de cada laboratório. A dessecação das cápsulas utilizando sílica-gel ou cloreto de cálcio pode ser mais facilmente reproduzida e com maior rapidez do que a secagem em câmara de fluxo de ar. Assim, é importante realizar novas experimentações, a fim de se identificar os efeitos da desidratação dos explantes, o tempo ótimo de desidratação e os ACPs testados, a fim de serem obtidos níveis adequados de umidade do material encapsulado para alcançar maiores taxas de regeneração do material exposto ao NL.

### 3.5 Experimento 5: Tempo de exposição ao PVS2

A exposição de cápsulas de 'BRS Caingá' ao PVS2 por 30 minutos resultou no maior valor para todas as variáveis analisadas, incluindo o tratamento controle (Figura 7). Isto pode sugerir que a solução de PVS2 tem um papel importante quanto ao equilíbrio osmótico com o meio de cultura, de tal modo que, quando utilizada no tempo adequado, aumente a permeabilidade da membrana para os compostos do meio e não seja tóxica ao explante.

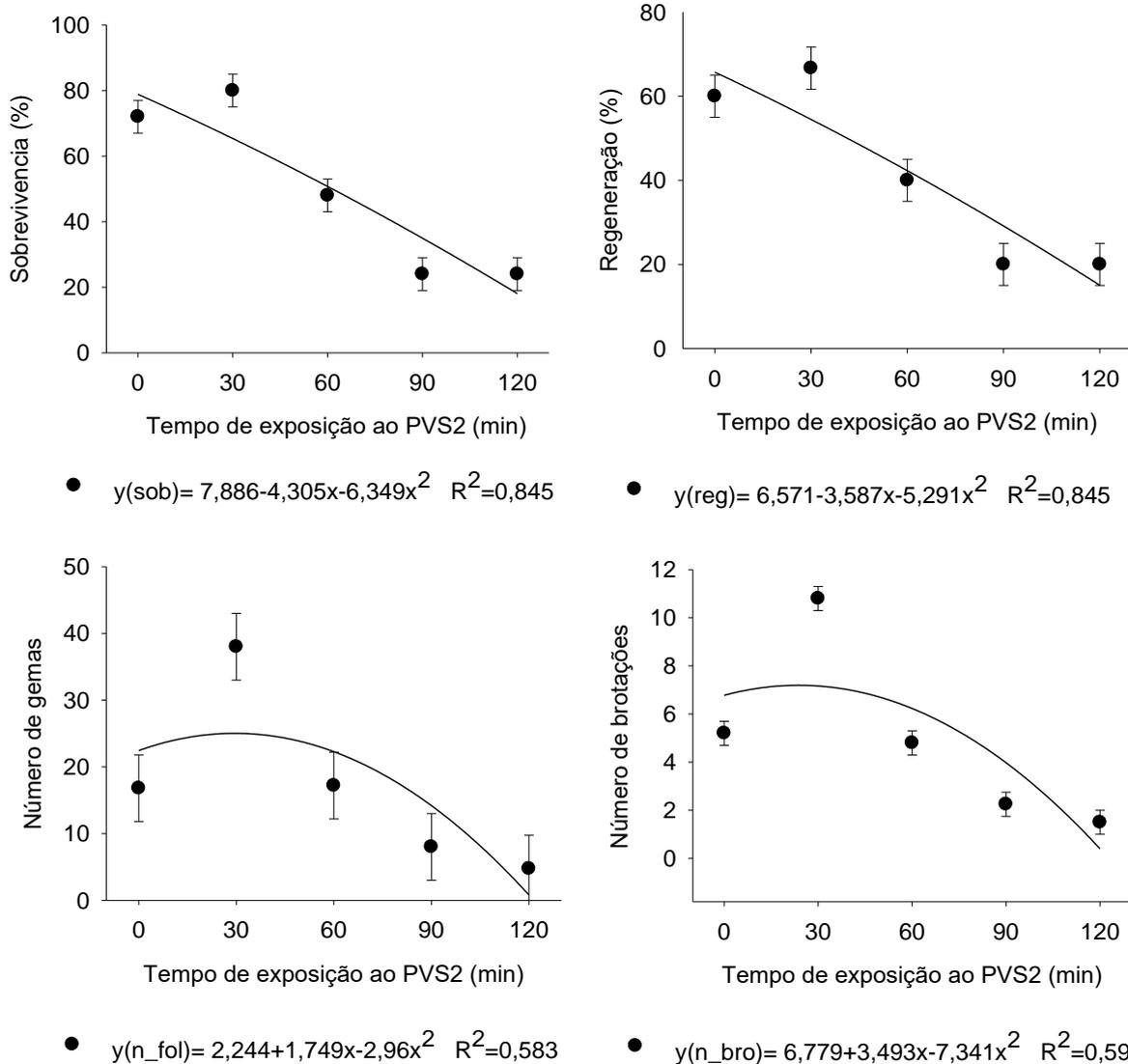


Figura 7 - Sobrevivência (%), regeneração (%), número de gemas e número de brotações de amoreira-preta 'BRS Caingá', ao longo do tempo de exposição à solução de vitrificação PVS2. Embrapa Clima Temperado, 2020. (As barras verticais representam o intervalo de confiança a 95%).

A PVS2 é eficiente na retirada de água dos tecidos vegetais em um curto período; se os explantes permanecerem além do necessário em contato com a solução pode ocorrer forte desidratação dos tecidos. Isto pode levar à toxicidade pelos compostos presentes na PVS2 e até à morte do material vegetal durante o período de recuperação pós-criopreservação pela nova troca osmótica e entrada de água na célula de maneira muito rápida na reidratação. Segundo Antony et al. (2010), a duração da exposição à PVS2 é um dos fatores que mais influenciam a recuperação pós-descongelamento dos explantes criopreservados.

A maior taxa de sobrevivência, regeneração, números de gemas e brotações alcançada quando se aplicou a PVS2 nos explantes de amoreira-preta 'BRS Caingá' durante 30 minutos pode ser um indicativo de que espécies vegetais do gênero *Rubus*, podem se beneficiar quando expostas a essa solução crioprotetora, antes da imersão em NL. O contato de tecidos vegetais recém excisados com soluções de criopreservação não deve ser superior ao período de 20-40 minutos quando a PVS contenha DMSO (TEIXEIRA, 2014; DIGILIO, 2014). Tempos de contato mais curtos, em caso de genótipos sensíveis, podem ser suficientes. Assim, depende-se de mais testes, buscando o equilíbrio entre o tempo de exposição e a tolerância dos explantes ao crioprotetor PVS2 na proteção ao congelamento de cápsulas de alginato de cálcio contendo explantes de 'BRS Caingá' criopreservados em NL.

### 3.6 Experimento 6: Pré condicionamento com sacarose ou DMSO

No presente experimento não ocorreu sobrevivência de explantes expostos ao NL, independentemente do pré-condicionamento ou do método de resfriamento (RL ou RU). Os explantes que foram expostos ao pré-tratamento em DMSO e não imersos em NL apresentaram necrose em 56% do material vegetal. A alta taxa de mortalidade dos explantes de 'BRS Cainguá' pode ter ocorrido em decorrência da toxicidade do DMSO, pela elevada penetrabilidade que o mesmo apresenta quando em contato prolongado com os tecidos vegetais. Diferindo dos resultados obtidos por Kovalchuk et al. (2010) que, ao observar o comportamento pós criopreservação de oito cultivares e três seleções de framboeseira vermelha, obtiveram de 20 a 81% (média 60,5%) de regeneração utilizando a metodologia de vitrificação em gota de DMSO aperfeiçoada.

A adição de DMSO ao MPC (T1) não apresentou efeitos positivos, diferentemente dos dados reportados por Reed e Hummer (1995), que trabalharam temperaturas alternadas de aclimação ao frio e 5% de DMSO adicionados ao meio de pré-criopreservação. Todavia, vale destacar que a metodologia utilizada pelos autores apresenta vários procedimentos que não foram testados, pois para o resfriamento em taxas variáveis ocorre a necessidade de freezers específicos, o qual o LCT possui, porém sem suprimento de NL contínuo como o equipamento exige.

Por outro lado, o material pré-tratado em MS rico em sacarose (T2 - 0,3 mol L<sup>-1</sup>), apresentou sobrevivência média de 77%, demonstrando que, mesmo expostos à desidratação durante 96 h, os explantes ainda apresentaram boa taxa de sobrevivência quando não imersos em NL (T1 e T2). Mathew et al. (2019) demonstraram a eficiência na regeneração de explantes de *Actinidia chinensis* var. *chinensis* 'Hort16A' quando tratadas previamente com sacarose e ácido ascórbico, obtendo 40% de regeneração, enquanto não ocorreu regeneração para o material sem pré-condicionamento.

Estudos adicionais devem ser conduzidos para obtenção de mais dados com a utilização de agentes osmóticos em pré-condicionamento e os métodos de RL e resfriamento RU a serem empregados para a criopreservação de explantes de amoreiras-pretas encapsulados em matriz de alginato de cálcio.

### 3.7 Experimento 7: Teste de PVS3 e resfriamento lento

Os tratamentos propostos não demonstraram benefícios para a criopreservação de *Rubus*. No presente trabalho, a adição dos ACP PVS2 e PVS3 com RL ou RU e imersão em NL resultou na completa necrose dos explantes após o reaquecimento.

Quando expostas ao PVS2, sem a imersão em NL, os explantes apresentaram sobrevivência média de 72% (Figura 8C) e formação de calos na base dos propágulos. Porém, quando expuseram os explantes a PVS3, houve forte formação de calosidade na base dos propágulos de *Rubus* e menor porcentagem de sobrevivência (56%) (Figura 8F). A formação de calos durante a regeneração pode ser um indicativo de desequilíbrio hormonal, levando à proliferação excessiva de células indiferenciadas, podendo influenciar geneticamente o material exposto às soluções. Por outro lado, a sobrevivência demonstra que a metodologia empregada poderá ser melhorada e atingir resultados mais sólidos

Em métodos de criopreservação baseados em vitrificação e encapsulamento, os estresses causados pelos tratamentos de pré-cultivo, carregamento e exposição de PVS2 e PVS3 podem induzir alterações genéticas e epigenéticas, na regeneração do material (MAGYAR TÁBORI et al., 2010; BEDNAREK; ORLOWSKA, 2019).

O material vegetal pode ter apresentado necrose ou desidratação em excesso devido aos compostos das soluções PVSs ou pelo longo período de exposição a elas, ocasionando toxicidade. Quando a solução PVS é empregada em temperatura ambiente, apresenta maior permeabilidade à membrana celular, assim, apresentando maior potencial de danos aos tecidos por toxicidade do que se a exposição ocorrer em baixas temperaturas (BETTONI et al., 2019; VOLK et al., 2006).

No material exposto ao resfriamento lento e imerso em NL, um dos principais problemas que pode ter ocorrido é a formação de cristais de gelo na solução extracelular, que ocorre quando há perda de água intracelular e desidratação por congelamento. Conseqüentemente, a desidratação celular causada pelo movimento da água do simplasto para o apoplasto ocasiona danos irreversíveis na membrana. Para as cápsulas onde se utilizou o método de congelamento RU, devido à quantidade de material a ser desidratado (cápsula+explante), apenas a desidratação osmótica pode não ter sido suficiente. As temperaturas no NL provocam a formação de cristais



Estudos adicionais devem ser conduzidos para a obtenção de mais dados buscando o sucesso da criopreservação utilizando encapsulamento. Os procedimentos de encapsulamento são trabalhosos e demorados, podendo levar horas ou dias em tratamentos pré-criogenia e horas para a desidratação; além disso, a toxicidade dos agentes crioprotetores e o manuseio dos explantes pode diminuir a eficiência deste método de conservação. Porém, se bem executado, o encapsulamento traz inúmeros benefícios ao manejo de genótipos de *Rubus*.

## 4 Conclusões

- Experimento 1: quanto à composição da cápsula para 'BRS Xingu', o alginato de cálcio em meio MS com ou sem carvão ativado pode ser utilizado, não necessitando a adição de BAP;
- Experimento 2: a criopreservação de 'BRS Xingu' pré-tratado com sacarose e vitrificada com PVS2 apresenta sobrevivência maior quando ácido ascórbico é adicionado à cápsula;
- Experimento 3: a adição da citocinina BAP ( $0,8 \text{ mg L}^{-1}$ ) apresenta maior eficiência na regeneração de explantes de amoreira-preta 'BRS Xingu';
- Experimento 4: a desidratação de cápsulas de 'BRS Xingu' por até 90 minutos, independente do agente desidratante, não foi suficiente na redução da umidade do conjunto cápsula /explante;
- Experimento 5: a exposição de cápsulas de 'BRS Caingá' à solução de vitrificação PVS2 por 30 minutos parece ser o tempo ideal por não apresentar toxidez;
- Experimento 6: o pré-tratamento de 'BRS Caingá' antes do encapsulamento em meio com 0,3 M de sacarose é menos tóxico do que com DMSO 5%;
- Experimento 7: para o encapsulamento-desidratação de 'BRS Xingu', a exposição à PVS2 pareceu ser menos tóxica que à PVS3.

## **CAPITULO 2**

**Vitrificação – Agentes crioprotetores PGD ou PVS2 em métodos de criopreservação clássico e moderno para a conservação in vitro de amoreira-preta**

## Introdução

O programa de melhoramento genético de amoreira-preta da Embrapa Clima Temperado vem contribuindo, nos últimos 48 anos, com o lançamento de cultivares que apresentam alto impacto econômico e social na fruticultura de clima temperado brasileira, como o caso da 'Tupy' e mais recentemente da 'BRS Xingu' (2015) e da 'BRS Caingá' (2019).

Um dos grandes desafios é a manutenção de grande volume de plantas dos BAGs e coleções de campo. Visando contornar este problema, desde a década de 80, o Laboratório de Cultura de Tecidos (LCT) da Embrapa Clima Temperado iniciou a aplicação de técnicas de micropropagação, o que proporciona a obtenção de mudas de elevada qualidade fitossanitária para o programa de melhoramento genético.

O LCT realiza a conservação de parte dos genótipos de interesse ao programa de melhoramento genético da amoreira-preta. Porém, o simples cultivo *in vitro* destes materiais demanda mão-de-obra especializada para a realização de subcultivos frequentes e, ainda assim, há a possibilidade de contaminações e variação somaclonal e elevado custo com pessoal, equipamentos e material de consumo.

Por isso, esforços vêm sendo realizados para melhorar e ampliar o tempo e a qualidade da conservação *in vitro*. Uma das formas mais promissoras de conservação a longo prazo é a criopreservação, pois pode contornar problemas como doenças e danos ambientais capazes de afetar materiais conservados por outros métodos *ex situ*, como cultura de meristemas ou ápices caulinares. A conservação em longo prazo proporciona vantagens como redução ou eliminação de danos genéticos, diminuição da necessidade de avaliações periódicas e controle da viabilidade, proporcionando a preservação de coleções por longos períodos, com segurança, baixo custo de manutenção e o armazenamento em pequenos volumes

A possibilidade de formação de cristais de gelo no interior das células, com o consequente rompimento destas, é a principal causa de inviabilidade dos métodos de criopreservação. Para contornar este problema, os procedimentos baseados na vitrificação são os métodos modernos mais utilizados. Nesses protocolos, preconiza-se o resfriamento ultrarrápido dos tecidos vegetais e das soluções protetoras. A vitrificação trata-se de um processo físico no qual uma solução aquosa se solidifica em um sólido metaestável amorfo, minimizando ou até mesmo inibindo a formação de cristais de gelo (NADARAJAN et al., 2020).

Para a vitrificação de explantes de plantas, uma prévia desidratação física ou osmótica pode ser necessária, e isso pode ser feito utilizando um meio de cultura com maior osmolaridade, pela adição de uma maior concentração de sacarose, por exemplo. Em seguida, uma solução osmoprotetora é utilizada para fazer o chamado “carregamento” – uma preparação biofísica dos tecidos vegetais para o estresse osmótico a que serão submetidos depois. A solução de carregamento mais comum foi descrita por Nishizawa et al. (1992), conhecida por loading solution (LS) e é composta por uma mistura de sacarose, glicerol e DMSO.

Na sequência, são utilizadas soluções de vitrificação (plant vitrification solution – PVS) que possuem características próprias desejáveis para a criopreservação: em baixas temperaturas, a viscosidade das PVS aumenta, formando um estado vítreo amorfo sem que ocorra a formação de cristais de gelo (TEIXEIRA et al., 2014). São compostas por uma mistura de agentes crioprotetores penetrantes, como glicerol, DMSO e propilenoglicol; e agentes crioprotetores não penetrantes, como sacarose, glicose, manitol e sorbitol.

O tipo de resfriamento também pode afetar o sucesso da vitrificação seguida de criopreservação. O resfriamento lento oferece uma maior taxa de perda de água da célula, minimizando a formação de gelo, porém maximizando a concentração intracelular dos agentes protetores, que podem ser tóxicas aos tecidos vegetais. O resfriamento rápido, por outro lado, minimiza a concentração de soluto, mas pode ocasionar a formação de cristais de gelo, uma vez que a água poderá não ter migrado suficientemente para fora da célula.

Com o objetivo de adaptar um método de criopreservação reproduzível para alguns genótipos de amoreira-preta conservados no país, a vitrificação foi estudada nesta parte do trabalho.

## 2 Material e métodos

### 2.1 Material Vegetal

Os genótipos de amoreira- preta (*Rubus sp.*) 'BRS Xingu', 'BRS Caingá', 'Tupy' e 'Comanche', utilizados para os estudos de vitrificação, foram multiplicados a partir da coleção de trabalho mantidos in vitro, pelo Laboratório de Cultura de Tecidos (LCT) da Embrapa Clima Temperado.

### 2.2 Cultivo e Multiplicação

Para o cultivo e multiplicação in vitro das cultivares em estudo, foram multiplicados segmentos caulinares de plantas previamente estabelecidas e cultivadas in vitro em meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) 100%, acrescido com 0,09 mol L<sup>-1</sup> de sacarose, gelificado com 7,5 g L<sup>-1</sup> ágar e suplementado com a citocinina BAP (0,8 mg L<sup>-1</sup>). O pH do meio foi ajustado para 6,0±0,1 antes da autoclavagem a 121 °C, durante 20 minutos. Este meio de cultura de multiplicação será denominado ao longo deste trabalho de MM e é descrito em detalhes por Dutra et al. (2010).

Os explantes utilizados nos experimentos foram multiplicados sequencialmente sempre que havia a necessidade de maior quantidade de material propagativo. Foram excisados segmentos nodais contendo duas gemas cada e cultivados durante 30 dias, em frasco de vidro com 30 mL de meio de cultura, em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 h sob irradiância de 36 µmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> e temperatura de 23±2 °C.

### 2.3 Vitrificação

Foi testada a viabilidade do uso da solução de vitrificação PGD com resfriamento lento ou rápido para a cultivar 'BRS Caingá'. Em seguida, foi avaliada a vitrificação de 'BRS Xingu' com resfriamento rápido e lento e solução PVS2. Seguindo

as adaptações do protocolo de vitrificação, os resfriamentos lento e rápido com PVS2 em ambiente resfriado (4 °C) foram testados para explantes de 'Tupy' e 'BRS Xingu'. Por fim, conforme os resultados foram sendo positivos nos testes anteriores, foi feito um experimento com quatro cultivares: 'Comanche', 'Tupy', 'BRS Xingu' e 'BRS Caingá', comparando também os resfriamentos lentos e rápidos, em ambientes resfriados.

### 2.3.1 Experimento 8 – Condicionamento com sacarose e DMSO, criopreservação com ou sem PGD e resfriamento lento

Plantas de amoreira-preta 'BRS Cainguá', após multiplicadas, permaneceram em sala de crescimento durante 30 dias (seção 2.2). Decorrido esse período, os frascos contendo as plantas em pleno crescimento foram dispostos em BOD com temperatura diurna de  $20\pm 1$  °C e fotoperíodo de 8 h e temperatura noturna de  $0\pm 1$  °C (16 h de escuro), durante 15 dias.

Decorridos os 15 dias de pré-condicionamento, os propágulos foram excisados das matrizes e dispostos em placas de Petri estéreis acrescidas de meio MS contendo  $0,3 \text{ mol L}^{-1}$  de sacarose e DMSO (5%), gelificado com ágar ( $7,5 \text{ g L}^{-1}$ ), dispostas em câmara BOD, no escuro e com temperatura de  $6\pm 1$  °C, por 24 h.

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial  $3 \times 2$  – sem congelamento, congelamento lento ou ultrarrápido e criotubos com ou sem adição da solução de vitrificação PGD, totalizando quatro tratamentos mais dois controles (com e sem exposição ao PGD) que após o tratamento foram dispostos em sala de crescimento sem passar pelo congelamento, cada tratamento sendo composto por cinco repetições e cinco gemas por repetição.

Após as 24 h de desidratação e pré-osmoproteção, os segmentos foram coletados e depositados em criotubos contendo 1 mL da solução de vitrificação PGD, durante 60 minutos. Decorrido esse período, trocou-se a solução por uma nova alíquota, para os tratamentos criopreservados com solução e retirou-se a solução PGD dos que foram congelados sem adição do crioprotetor.

Os tratamentos testados foram os seguintes:

T1 – Controle sem PGD, sem resfriamento;

T2 – Controle com PGD, sem resfriamento;

T3 – Sem PGD, resfriamento lento ( $-1 \text{ °C min}^{-1}$  até  $-20 \text{ °C}$ ), imersão em NL;

T4 – Com PGD, resfriamento lento ( $-1 \text{ °C min}^{-1}$  até  $-20 \text{ °C}$ ), imersão em NL;

T5 – Sem PGD, resfriamento rápido (imersão em NL);

T6 – Com PGD, resfriamento rápido (imersão em NL);

Os explantes dos tratamentos submetidos a resfriamento rápido foram imersos em nitrogênio líquido, onde permaneceram por sete dias ou aqueles submetidos a resfriamento lento foram dispostos em recipiente próprio para este fim. Empregaram-se embalagens crioprotetoras (NALGENE® MR. FROSTY® CRYO -1° C FREEZING CONTAINERS) adicionadas de isopropanol, onde se inseriram os criotubos. Os containers foram dispostos em freezer durante 60 minutos, ou até a temperatura dos criotubos atingir -20 °C, momento em que os criotubos foram imersos em NL.

Após os sete dias de criopreservação, o material foi resgatado do NL, passando então pelo processo de descongelamento em banho-maria com água aquecida a 45 °C durante 2-3 minutos, até o completo aquecimento das gemas e descristalização do crioprotetor. Em seguida, removeram-se os criotubos do banho-maria, retirou-se a solução PGD e adicionou-se a solução de recuperação (RS) composta por meio MS, sacarose 0,09 mol L<sup>-1</sup> e 1 g L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico, deixando-a em contato com os explantes durante 20 minutos, em temperatura ambiente (24±2 °C). Após o descongelamento, os propágulos foram dispostos em frascos contendo meio de cultura MS, com 0,09 mol L<sup>-1</sup> de sacarose, suplementado com citocinina (BAP; 0,8 mg L<sup>-1</sup>) e gelificado com 7,5 g L<sup>-1</sup> ágar. O pH do meio foi ajustado para 6,0±0,1 antes da autoclavagem a 121 °C, durante 20 minutos, e os frascos permaneceram por sete dias no escuro, com temperatura controlada de 23±2 °C. Posteriormente, foram dispostas em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 h, sob irradiância de 36 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> e temperatura de 23±2 °C.

As variáveis avaliadas após os 30 dias de cultivo foram porcentagem de sobrevivência e regeneração de gemas dos materiais submetidos ao processo de criopreservação.

### 2.3.2 Experimento 9 – Vitrificação 'BRS Xingu', resfriamento rápido/lento

Plantas de amoreira-preta 'BRS Xingu' pré-estabelecidas in vitro foram multiplicadas e mantidas em sala de crescimento durante 30 dias (seção 2.2). Decorrido esse período, foram excisadas gemas com comprimento entre 1 e 2 mm, depositadas em placas de Petri descartáveis contendo 25 mL de meio de cultura MS, acrescido de 0,3 mol L<sup>-1</sup> de sacarose, gelificados com 7,5 g L<sup>-1</sup> ágar, com pH ajustado para 6,0±0,1 antes da autoclavagem a 121 °C, durante 20 minutos. Após distribuídos nas placas, os propágulos permaneceram em BOD (6±1 °C), no escuro durante 96 h.

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema unifatorial congelamento (lento ou ultrarrápido), totalizando seis tratamentos sendo dois controles dos quais: T1 não exposto ao NL e T2 exposto ao NL sem tratamentos prévios. Cada tratamento foi composto por cinco repetições e cinco explantes por repetição.

Os tratamentos constituíram-se da variação do condicionamento (resfriamento lento – RL- ou ultrarrápido – imersão em NL):

T1 – Controle (MS, sala de crescimento);

T2 – Controle NL; (MS, sala de crescimento);

T3 – LS (20 min); PVS2 (40 min); RS (20 min.); MS; escuro (7 dias);

T4 – LS (20 min); PVS2 (40 min); NL (7 dias); RS (20 min.); MS; escuro (7 dias);

T5 – LS (20 min); PVS2 (40 min); RL (90 min); RS (20 min.); MS; escuro (7 dias);

T6 – LS (20 min); PVS2 (40 min); RL (90 min); NL (7 dias); RS (20 min.); MS; escuro (7 dias);

Os explantes dos tratamentos submetidos a resfriamento ultrarrápido foram imediatamente imersos em nitrogênio líquido, onde permaneceram por sete dias. Para o congelamento lento, os criotubos foram dispostos em embalagens destinadas ao resfriamento lento (NALGENE® MR. FROSTY® CRYO -1° C FREEZING CONTAINERS). Os containers foram dispostos em freezer durante 60 minutos, ou até a temperatura dos criotubos atingir -20° C, momento em que os criotubos foram imersos em NL.

Após os sete dias de criopreservação, o material foi resgatado do NL, passando então pelo processo de descongelamento em banho-maria com água aquecida a 45 °C durante 2-3 minutos, até o completo aquecimento das gemas e descristalização do crioprotetor. Em seguida, removeram-se os criotubos do banho-maria, retirou-se a solução PVS2 e adicionou-se a solução de recuperação RS, deixando-a em contato com os explantes durante 20 minutos, à temperatura ambiente ( $24\pm 2$  °C). Os propágulos então foram inoculados em frascos contendo meio de cultura MS, com  $0,09 \text{ mol L}^{-1}$  de sacarose, suplementado com citocinina (BAP;  $0,8 \text{ mg L}^{-1}$ ) e gelificado com  $7,5 \text{ g L}^{-1}$  de ágar. O pH do meio foi ajustado para  $6,0\pm 0,1$  antes da autoclavagem a 121 °C, durante 20 minutos, permanecendo por sete dias no escuro, com temperatura controlada de  $23\pm 2$  °C.

Posteriormente, foram dispostos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 h, sob irradiância de  $36 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  e temperatura de  $23\pm 2$  °C.

As variáveis avaliadas após os 30 dias de cultivo foram a porcentagem de sobrevivência e regeneração de gemas dos materiais vegetais submetidos aos experimentos de vitrificação.

### 2.3.3 Experimento 10 – Vitrificação ‘BRS Xingu’ e ‘Tupy’, resfriamento lento e rápido em ambiente resfriado

Plantas de amoreiras-pretas ‘Tupy’ e ‘BRS Xingu’ foram multiplicadas e mantidas em sala de crescimento durante 30 dias (seção 2.2). Decorrido esse período, os frascos foram submetidos ao condicionamento de frio em BOD ( $0\pm 1$  °C e 16 h de escuro/ $20\pm 1$  °C e 8 h de luz), durante 15 dias. Foram excisados segmentos caulinares com comprimento aproximado entre 1 e 2 mm, os quais foram inoculados em placas de Petri descartáveis contendo 25 mL de meio de cultura MS, acrescido de  $0,3 \text{ mol L}^{-1}$  de sacarose, gelificados com  $7,5 \text{ g L}^{-1}$  ágar, com pH ajustado para  $6,0\pm 0,1$  antes da autoclavagem a 121 °C, durante 20 minutos. Após distribuídos nas placas, os propágulos permaneceram em BOD ( $6\pm 1$  °C), no escuro durante 24 h.

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, com quatro tratamentos por cultivar, cada tratamento composto por cinco repetições e cinco explantes por repetição. Os tratamentos constituíram-se da variação quanto ao resfriamento lento (RL) ou ultrarrápido (imersão direta em nitrogênio líquido – NL), sendo assim distribuídos:

T1 – Controle (MS+BAP  $0,8 \text{ mg L}^{-1}$ +GA<sub>3</sub>  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ ), sem resfriamento;

T2 – Controle pré-congelamento, LS (20 min) + PVS2 (40 min) + RS (20 min) + MS (MS+BAP  $0,8 \text{ mg L}^{-1}$ +GA<sub>3</sub>  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ ), sem resfriamento;

T3 - LS (20 min) + PVS2 (40 min) + NL (7 dias) + RS (20 min) + MS (MS+BAP  $0,8 \text{ mg L}^{-1}$  + GA<sub>3</sub>  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ );

T4 - LS (20 min) + PVS2 (40 min) +RL (60 min.) + NL (7 dias) + RS (20 min) + MS (MS+BAP  $0,8 \text{ mg L}^{-1}$ +GA<sub>3</sub>  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ ).

Os tratamentos controle, foram inoculados e dispostos em sala de crescimento com temperatura e luminosidade controladas,  $23\pm 2$  °C e fotoperíodo de 16 h sob irradiância de  $36 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , respectivamente. O tratamento pré-congelamento, assim como os explantes criopreservados, passaram pelas etapas de condicionamento em solução de carregamento LS durante 20 minutos em temperatura de 4 °C, esta solução foi trocada pela solução de vitrificação PVS2 que foi deixada em contato com os propágulos por um período de 40 minutos também a 4 °C. Posteriormente, substituiu-se a solução do controle pela solução RS na qual os propágulos

permaneceram por mais 20 minutos antes de serem dispostos nos frascos contendo meio de cultura MS + BAP  $0,8 \text{ mg L}^{-1}$  + GA<sub>3</sub>  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ , meio este que foi denominado meio de multiplicação 2 – MM2.

Nos tratamentos a serem criopreservados, realizou-se a troca da alíquota inicial de PVS2 por uma nova fração. Neste momento, as parcelas dos tratamentos em resfriamento rápido foram imediatamente submetidas ao NL, onde permaneceram por sete dias. O material a ser resfriado para congelamento lento foi disposto em embalagens destinadas para este fim (NALGENE® MR. FROSTY® CRYO  $-1^\circ \text{C}$  FREEZING CONTAINERS) adicionadas de isopropanol. Os containers foram dispostos em freezer durante 60 minutos, ou até a temperatura dos criotubos atingir  $-20^\circ \text{C}$ , momento em foram imersos em NL.

Após os sete dias de criopreservação, o material foi resgatado do NL, passando então pelo processo de descongelamento em banho-maria com água aquecida a  $45^\circ \text{C}$  durante 2-3 minutos, até o completo aquecimento das gemas e descristalização do crioprotetor. Em seguida, removeram-se os criotubos do banho-maria, retirando-se a solução PVS2 e adicionando a solução de recuperação RS, deixando-a em contato com os explantes durante 20 minutos, em temperatura ambiente ( $24 \pm 2^\circ \text{C}$ ). Os propágulos então foram inoculados em frascos contendo meio de cultura MS, com  $0,09 \text{ mol L}^{-1}$  de sacarose, suplementado com citocinina (BAP  $0,8 \text{ mg L}^{-1}$ ) e gelificado com  $7,5 \text{ g L}^{-1}$  ágar. O pH do meio foi ajustado para  $6,0 \pm 0,1$  antes da autoclavagem a  $121^\circ \text{C}$ , durante 20 minutos, permanecendo por sete dias no escuro com temperatura controlada de  $23 \pm 2^\circ \text{C}$ . Posteriormente, foram dispostos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 h, sob irradiância de  $36 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  e temperatura de  $23 \pm 2^\circ \text{C}$ .

As variáveis avaliadas após os 30 dias de cultivo foram: porcentagem de sobrevivência e regeneração dos tecidos submetidos ao procedimento de criopreservação.

### 2.3.4 Experimento 11 – Pré-condicionamento e vitrificação de cultivares de amoreira-preta

Plantas de amoreiras-pretas ‘Comanche’, ‘Tupy’, ‘BRS Xingu’ e ‘BRS Caingua’ pré-estabelecidas in vitro foram multiplicadas em MM2 (MS + BAP 0,8 mg L<sup>-1</sup>+ GA<sub>3</sub> 0,1 mg L<sup>-1</sup>) e mantidas em sala de crescimento durante 30 dias. Após esse período, os frascos contendo as plântulas em pleno crescimento foram dispostos em BOD com temperatura diurna de 20±1 °C, e fotoperíodo de 8 h e temperatura noturna de 0±1 °C (16 h de escuro), durante 21 dias.

Decorridos os dias de condicionamento, os propágulos foram excisados das matrizes e dispostos em placas de Petri estéreis contendo 25 mL de meio de cultura MS e seus sais, acrescido de 0,3 mol L<sup>-1</sup> de sacarose e gelificado com ágar 7,5 g L<sup>-1</sup>, com pH ajustado para 6,0±0,1 antes da autoclavagem a 121 °C, durante 20 minutos. As placas foram dispostas em câmara BOD, no escuro e com temperatura de 6±1 °C, permanecendo nessas condições por 24 h.

Os tratamentos constituíram-se na aplicação de metodologia de resfriamento rápido e lento para criopreservação de propágulos das quatro cultivares, utilizando-se soluções osmoprotetoras e soluções de vitrificação mantidas a baixa temperatura durante o condicionamento (4 °C) e à presença ou não do PVS2 no criotubo.

T1 – Controle pré-congelamento – LS (20 min) + PVS2 (40 min) + RS (20 min) + MS + BAP 0,8 mg L<sup>-1</sup>+ GA<sub>3</sub> 0,1 mg L<sup>-1</sup>;

T2 – LS (20 min) + PVS2 (40 min) + NLcomPVS2 (7 dias) + RS (20 min) + MS (MS+BAP 0,8mg L<sup>-1</sup>+GA<sub>3</sub> 0,1mg L<sup>-1</sup>);

T3 - LS (20 min) + PVS2 (40 min) + RL (60 min) + NLcomPVS2 (7 dias) + RS (20 min) + MS (MS+BAP 0,8mg L<sup>-1</sup>+GA<sub>3</sub> 0,1mg L<sup>-1</sup>).

T4 - LS (20 min) + PVS2 (40 min) + NL (7 dias) + RS (20) + MS (MS+BAP 0,8 mg L<sup>-1</sup>+GA<sub>3</sub> 0,1 mg L<sup>-1</sup>).

Os tratamentos controles foram inoculados e dispostos em sala de crescimento com temperatura e luminosidade controladas, 23±2°C e fotoperíodo de 16 h sob irradiância de 36 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>, respectivamente. O tratamento pré-congelamento (T2), assim como os explantes criopreservados, passaram pelas etapas de condicionamento em solução LS durante 20 minutos em temperatura de 4 °C,

trocando-se em seguida pela solução de vitrificação PVS2, deixando-o em contato com os propágulos por um período de 40 minutos a 4°C. Posteriormente, substituiu-se a solução do controle pela solução RS na qual os propágulos permaneceram por mais 20 minutos antes de serem dispostos nos frascos contendo meio de cultura.

Nos tratamentos T2 e T3, foi realizada a troca da alíquota inicial de PVS2 por uma nova fração, enquanto no tratamento T4 a solução inicial de PVS2 foi apenas retirada. Nesse momento, os explantes a serem submetidos ao resfriamento ultrarrápido foram imediatamente imersos em NL. Os materiais resfriados com taxa de congelamento lento, por sua vez, foram dispostos em embalagens crioprotetoras (NALGENE® MR. FROSTY® CRYO -1° C FREEZING CONTAINERS) adicionadas de isopropanol. Os containers foram dispostos em freezer durante 60 minutos, ou até a temperatura dos criotubos atingir -20° C, momento em que foram imersos em NL.

Após os sete dias de criopreservação, o material foi resgatado do NL, passando então pelo processo de descongelamento em banho-maria com água aquecida a 45 °C durante 2-3 minutos, até o completo aquecimento das gemas e descristalização do crioprotetor. Em seguida, removeram-se os criotubos do banho-maria, retirando-se a solução PVS2 e adicionando a solução de recuperação RS, deixando-a em contato com os explantes durante 20 minutos, em temperatura ambiente (24±2 °C). Os propágulos então foram inoculados em frascos contendo meio de cultura MS, com 0,09 mol L<sup>-1</sup> de sacarose, suplementado com citocinina (BAP; 0,8 mg L<sup>-1</sup>) e gelificado com 7,5 g L<sup>-1</sup> ágar. O pH do meio foi ajustado para 6,0±1 antes da autoclavagem a 121 °C, durante 20 minutos, permanecendo por 7 dias no escuro com temperatura controlada de 23±2 °C.

Posteriormente, os frascos foram dispostos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 h, sob irradiância de 36 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> e temperatura de 23±2 °C.

Os tratamentos constituíram-se da variação do condicionamento pré-congelamento (resfriamento lento ou ultrarrápido). O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado e um fator experimental caracterizado como congelamento (lento ou ultrarrápido), totalizando quatro tratamentos para cada cultivar (16 tratamentos totais), cada tratamento composto por cinco repetições e cinco propágulos por repetição.

As variáveis avaliadas após os 30 dias de cultivo foram porcentagem sobrevivência e regeneração, após a criopreservação de explantes axilares de amoreiras-pretas.

## 2.4 Análises estatísticas

Os experimentos foram conduzidos adotando-se o delineamento inteiramente ao acaso. Os dados foram analisados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro Wilk; à homocedasticidade pelo teste de Hartley; e à independência dos resíduos por análise gráfica. Posteriormente, os dados foram submetidos à análise de variância através do teste F ( $p \leq 0,05$ ). Constatando-se significância estatística, os dados foram comparados por testes de probabilidade quando as variáveis se apresentarem de forma qualitativa, de acordo com a necessidade apresentada pelos dados de cada experimento.

### 3 Resultados e Discussão

A seguir serão expostos os resultados alcançados a partir da técnica de criopreservação por vitrificação do material propagativo de *Rubus* pela imersão em NL:

#### 3.1 Experimento 8 – Condicionamento com sacarose e DMSO, criopreservação com ou sem PGD e resfriamento lento

No presente experimento, não se obteve sobrevivência de explantes expostos ao NL, independentemente do método de resfriamento (RL ou RU). Além da necrose total dos materiais expostos ao NL (Figuras 9C, 9D, 9E, 9F), houve também mortalidade dos explantes controles pré-tratados em sacarose e DMSO e expostos à solução PGD (68% de mortalidade) (Figura 9B). Essa perda de material propagativo pode ter ocorrido devido à excessiva desidratação da combinação dos reguladores sacarose e do DMSO em contato excessivo com os explantes ou pelos componentes da fórmula PGD em contato com os tecidos vegetais.

Ao pesquisarem o comportamento pós-criopreservação de oito cultivares e três seleções de framboeseira vermelha, utilizando a metodologia de vitrificação em gota de DMSO, Kovalchuk et al. (2010) obtiveram taxas de 20 a 81% (média 60,5%) de regeneração. Possivelmente a utilização da vitrificação em gota atingiu alta taxa de resfriamento (devido à folha de alumínio). Assim os solutos intra e extracelulares não formaram cristais de gelo, que poderiam romper as membranas e organelas.

Nos tratamentos sem imersão em NL, explantes pré-tratados, que não foram expostos à solução PGD, apresentaram sobrevivência média de 92%, mesmo expostos durante 24 h à dessecação. Diferentemente dos dados obtidos no presente estudo, a primeira literatura a descrever a aplicação de técnicas de criopreservação em plantas de *Rubus* utilizou a combinação de crioprotetor PGD (REED; LAGERSTEDT, 1987).

Para o resfriamento em taxas variáveis e a utilização da solução PGD ocorre a necessidade de freezers programáveis para que a taxa de resfriamento seja adequada à cultura da amoreira-preta. A obtenção de mais dados com utilização de agentes

osmóticos em pré-condicionamento e os métodos de RL e resfriamento RU ainda carecem de mais estudos.

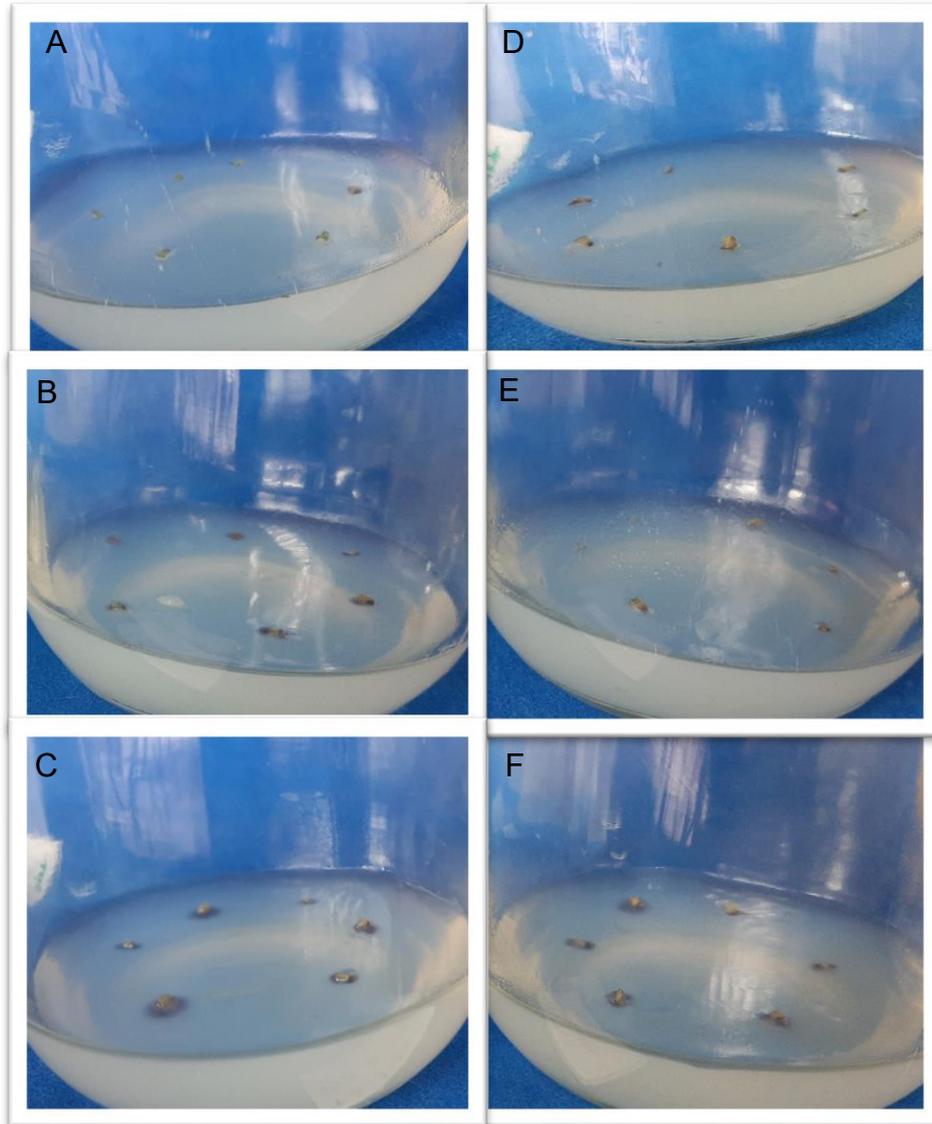


Figura 9 – Explantes de amoreira-preta ‘BRS Caingá’ submetidas a condicionamento com sacarose e DMSO criopreservadas com ou sem solução PGD nos criotubos e aplicação da metodologia de resfriamento lento (A -T1 – Controle sem PGD, sem resfriamento; B -T2 – Controle com PGD, sem resfriamento; C -T3 – Sem PGD, resfriamento lento ( $-1\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$  até  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), imersão em NL; D -T4 – Com PGD, resfriamento lento ( $-1\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$  até  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), imersão em NL; E -T5 – Sem PGD, resfriamento rápido (imersão em NL); F -T6 – Com PGD, resfriamento rápido (imersão em NL));  
Fonte: COPATTI, 2020.

### 3.2 Experimento 9 – Vitrificação ‘BRS Xingu’, Resfriamento Rápido/Lento

Os tratamentos propostos apresentaram poucos benefícios para a criopreservação de *Rubus*. Os tratamentos onde ocorreu a imersão dos tecidos vegetais em NL (Figuras 10B, 10D, 10F) não apresentaram sobrevivência de explantes. Observou-se que a necrose dos tecidos ocorreu com ou sem a aplicação prévia de tratamentos osmoprotetores, de vitrificação ou métodos de resfriamento lento ou rápido.

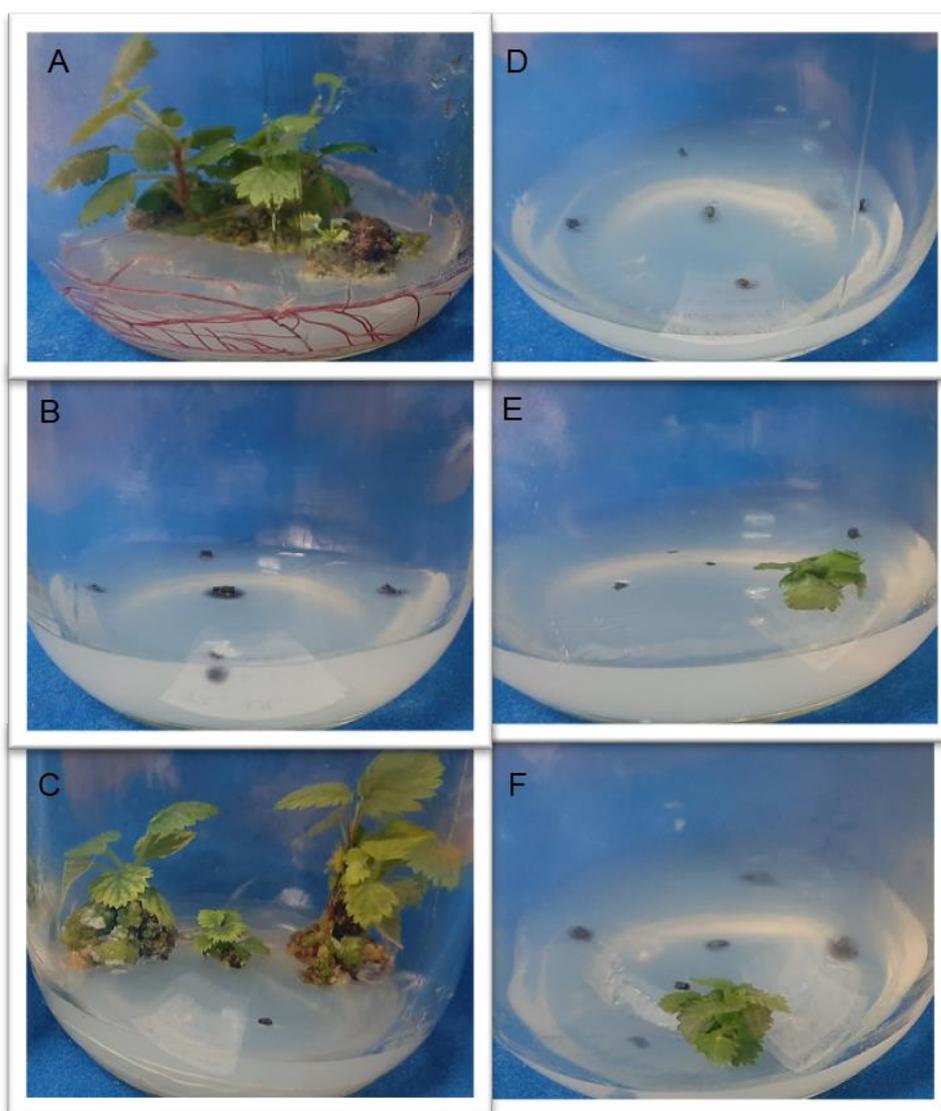


Figura 10 – Vitrificação ‘BRS Xingu’, resultados obtidos no experimento 9 com a aplicação de técnicas de resfriamento lento e resfriamento rápido para a criopreservação (A -T1 – Controle (MS, sala de crescimento); B -T2 – Controle NL; (MS, sala de crescimento); C -T3 – LS (20 min); PVS2 (40 min); RS (20 min.); MS; escuro (7 dias); D -T4 – LS (20 min); PVS2 (40 min); NL (7 dias); RS (20 min.); MS; escuro (7 dias); E -T5 – LS (20 min); PVS2 (40 min); RL (90 min); RS (20 min.); MS; escuro (7 dias); F -T6 – LS (20 min); PVS2 (40 min); RL (90 min); NL (7 dias); RS (20 min.); MS; escuro (7 dias));  
Fonte: COPATTI, 2020.

O tratamento T5 (Figura 10E) apresentou 12% de sobrevivência, com formação de brotos e calos na base dos tecidos, possivelmente pela não aclimação das plantas ao resfriamento. Na natureza, a tolerância ao congelamento é induzida pelo outono (temperaturas e fotoperíodo decrescentes); em laboratório, é mimetizado pelo uso de câmaras BOD com controle de temperatura e fotoperíodo. Nesse processo, as plantas retiram água dos tecidos, impedindo danos celulares causados pela formação de cristais de gelo (TAIZ, ZEIGER; 2017). A complexidade das operações no RL e a falta de equipamentos que controlam a taxa de resfriamento faz com que ocorra a formação de cristais de gelo nas soluções extracelulares, causando perda de água pelas células no processo chamado de desidratação por congelamento (KIM et al. 2004; WANG et al., 2014).

Já o tratamento T3 (Figura 10C), o qual passou por todos os passos da criopreservação menos o resfriamento, apresentou 44% de sobrevivência do material. Observou-se grande formação de calogênese nesse material, possivelmente ocasionada pela presença de BAP em excesso no meio de regeneração, promovendo desbalanços entre os reguladores de crescimento endógenos e os exógenos adicionados ao meio de regeneração, aliado ao estresse causado aos explantes pelos processos realizados para a aplicação da criopreservação.

Quando utilizados em concentrações inadequadas, reguladores de crescimento podem estimular o desenvolvimento de calos (WANG et al., 2000; LAMBARDI; FABBRI; CACCAVALE, 2000), porém, é fundamental a regeneração das culturas por meio de crescimento direto de estrutura diferenciada, sem o desenvolvimento de calo, para evitar problemas de variação somaclonal (MATSUMOTO, 2017; CHAROENSUB; HIRAI; SAKAI, 2004).

Diferentemente dos tratamentos anteriores, o controle apresentou, regeneração média de 68% (Figura 10A). Apesar de ser uma boa taxa de regeneração, esse material não passou por processos de estressantes e criogênicos, podendo ter apresentado baixa viabilidade possivelmente devido às injúrias causadas na excisão do explantes. Vale destacar que, para a aplicação das técnicas de criopreservação, o tamanho dos explantes é importante, visto que, quanto menor o explante, menor o conteúdo de água que deverá ser trocado através dos processos de desidratação.

### 3.3 Experimento 10 – Vitrificação ‘BRS Xingu’ e ‘Tupy’, Resfriamento Lento e Ultrarrápido em Ambiente Resfriado

No presente experimento ocorreram elevados níveis de contaminação fúngica em alguns tratamentos (‘BRS Xingu’ 16%, 12% e 20% de contaminação fúngica nos tratamentos T2, T3 e T4 (Figuras 11B, 11C, 11D), respectivamente; e ‘Tupy’ 32% e 40% nos tratamentos T2 e T3 (Figuras 11F, 11G) respectivamente). Provavelmente isso ocorreu devido à necessidade de manejar os criotubos entre ambientes (fluxo laminar x caixa térmica; tanque de NL x fluxo laminar) para se realizar os tratamentos a baixa temperatura, constatando-se a necessidade de medidas para prevenir a perda de material por contaminações externas. Assim, apenas puderam ser avaliados o percentual de sobrevivência dos explantes uma única vez, aos 30 dias de cultivo pós-criopreservação.

Quando se avaliou a aplicação de RL ou RU com a adição de PVS2 junto aos explantes submetidos à criopreservação em NL, os tratamentos propostos apresentaram diferença significativa para a sobrevivência nas cultivares de amoreira-preta avaliadas: ‘BRS Xingu’ (F: 20,72;  $p < 0,0001$ ) e ‘Tupy’ (F: 46,85;  $p < 0,0001$ ). Após a recuperação dos explantes, constatou-se que o contato da solução PVS2 com os explantes resultou em elevados índices de mortalidade (50-76%), para as cultivares ‘BRS Xingu’ e ‘Tupy’ respectivamente (Tabela 5).

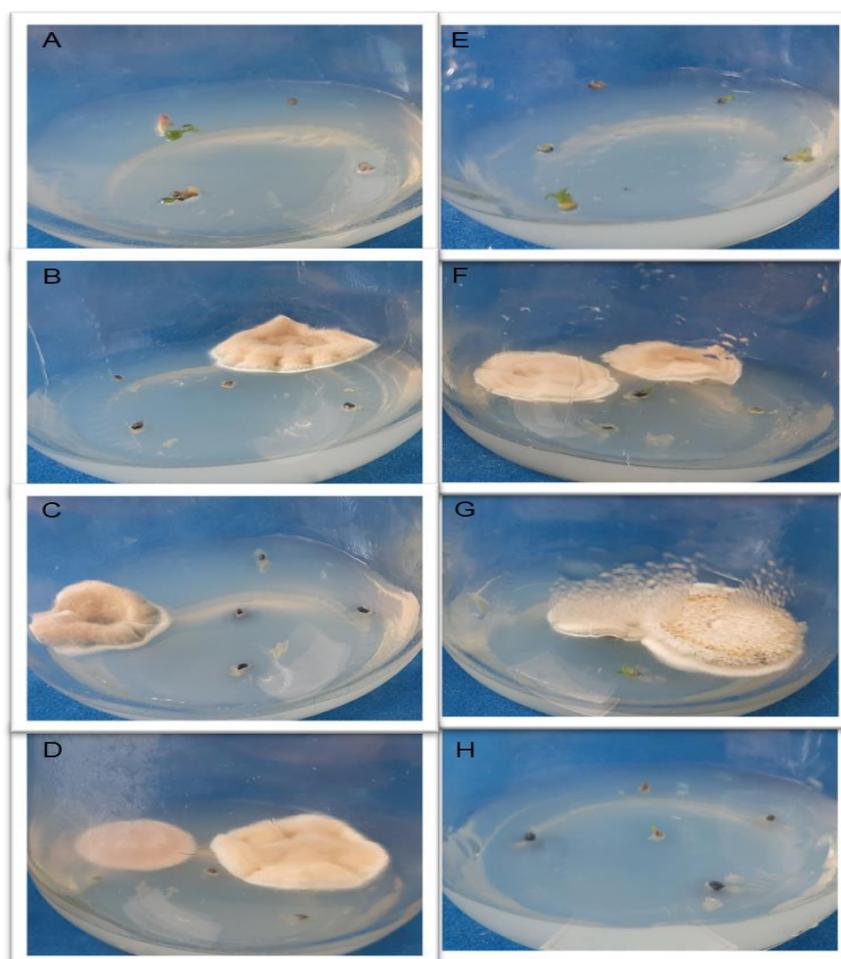


Figura 11 – Vitrificação ‘BRS Xingu’ e ‘Tupy’, aplicação das técnicas de resfriamento lento e ultrarrápido em explantes submetidos ao précondicionamento (aclimatização) em ambiente resfriado: A, E -T1 – Controle (MS+BAP 0,8 mg L<sup>-1</sup>+GA<sub>3</sub> 0,1 mg L<sup>-1</sup>), sem resfriamento; B, F- T2 – Controle pré-congelamento, LS (20 min) + PVS2 (40 min) + RS (20 min) + MS (MS+BAP 0,8 mg L<sup>-1</sup>+GA<sub>3</sub> 0,1 mg L<sup>-1</sup>), sem resfriamento; C, G -T3 - LS (20 min) + PVS2 (40 min) + NL (7 dias) + RS (20 min) + MS (MS+BAP 0,8 mg L<sup>-1</sup> + GA<sub>3</sub> 0,1 mg L<sup>-1</sup>); D, H -T4 - LS (20 min) + PVS2 (40 min) +RL (60 min.) + NL (7 dias) + RS (20 min) + MS (MS+BAP 0,8 mg L<sup>-1</sup>+GA<sub>3</sub> 0,1 mg L<sup>-1</sup>).

Fonte: COPATTI, 2020.

Tabela 5: Sobrevivência de explantes de amoreira-preta, ‘BRS Xingu’ e ‘Tupy’, submetidos à vitrificação utilizando RL e RU (EMBRAPA Clima Temperado, Pelotas, RS, Brasil, 2021).

Tratamentos	Sobrevivência	
	‘BRS Xingu’	‘Tupy’
Controle (LS, RS, MS)*	91 a <sup>‡</sup>	96 a
LS, PVS2, RS, MS**	30 b	36 cd
LS, PVS2, NL, BM, RS, MS***	0 b	24 de
LS, PVS2, RL, NL, BM, RS, MS****	50 b	28 def

\* Controle: LS (20 min); PVS2 (40 min); RS (20 min); MS (0,8 mg L<sup>-1</sup> BAP+ 0,1 mg L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>); \*\*LS (20 min); PVS2 (40 min); RS (20 min); MS; \*\*\*LS (20 min); PVS2 (40 min); NL; BM (2 min/ 45°C); RS (20 min); MS; \*\*\*\*LS (20 min); PVS2 (40 min); RL (60 min); NL; BM (2 min/ 45°C); RS (20 min); MS.

<sup>‡</sup> Médias (de cinco repetições) acompanhadas por mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey (p<0,05) comparando os tratamentos de vitrificação com RL e RU.

A imersão dos tecidos diretamente em NL apresentou efeitos diversos entre as cultivares: 'Tupy' apresentou 24% de sobrevivência, não apresentando diferença estatística se comparado ao tratamento que passou pelo RL antes da imersão em NL. Para 'BRS Xingu', por sua vez, não houve sobrevivência de explantes imersos diretamente em NL; porém, quando os explantes passaram pelo processo de RL em conjunto com a imersão em NL, a sobrevivência foi de 50% de sobrevivência. O resfriamento lento pode ter interferido de maneira positiva na sobrevivência dos explantes de 'BRS Xingu'. Com a diminuição da temperatura da solução de criopreservação e a implementação do RL, ocorreu aumento da sobrevivência, possivelmente a viscosidade e conseqüentemente a permeabilidade da solução criogênica nas células vegetais diminuiu. Porém, sem cessar os processos de desidratação osmótica dos tecidos enquanto os explantes estiveram expostos às baixas temperaturas, diminuindo a quantidade de moléculas de água livre e ocasionando maior porcentagem de sobrevivência após a recuperação e regeneração dos genótipos criopreservados.

Durante os processos de aclimatização ao frio, espécies de clima temperado mobilizam a água dos vasos para impedir danos causados às células pela formação de cristais de gelo. As temperaturas baixas alteram as propriedades físicas da membrana, aumentando a rigidez, o que leva à ativação de mecanismos crioprotetores e enzimas que realizam a reprogramação metabólica de lipídeos, açúcares, a biossíntese de solutos e a desativação de espécies reativas de oxigênio (ERO) (TAIZ; ZEIGER, 2017).

A otimização das concentrações, a duração do pré-condicionamento e as condições dos explantes são importantes para melhorar a tolerância ao processo de desidratação. O pré-tratamento em meio rico em sacarose protege a estabilidade das membranas sob condições de severa desidratação, aumentando as concentrações de amido presentes nos tecidos vegetais (MATHEW et al., 2018; KULLUS; SEROCKA; MIKULA, 2018).

### 3.4 Experimento 11 – Pré-condicionamento e vitrificação de cultivares de amoreira-preta

Quando se avaliou a aplicação de RL ou RU com a adição ou não de PVS2 junto aos explantes submetidos à criopreservação em NL, houve diferença significativa entre os tratamentos para a sobrevivência das cultivares de amoreira-preta avaliadas: ‘Comanche’ (F: 26,43;  $p < 0,0001$ ), ‘Tupy’ (F: 215,0;  $p < 0,0001$ ), ‘BRS Xingu’ (F: 39,97;  $p < 0,0001$ ) e ‘BRS Caingá’ (F: 12,58;  $p < 0,0001$ ).

Pelos dados obtidos no presente experimento, pode-se observar que a aplicação da aclimatação com variação da temperatura (0 °C noite e 20 °C dia) durante 15 dias, o pré-condicionamento com sacarose (0,3 mol L<sup>-1</sup>) e a imersão em NL sem PVS2 nos criotubos, foi o tratamento que apresentou maiores taxas de sobrevivência, dentre os tratamentos propostos (Tabela 6).

Tabela 6 – Sobrevivência de explantes de amoreira-preta, ‘Comanche’, ‘Tupy’, ‘BRS Xingu’ e ‘BRS Caingá’, submetidos à vitrificação utilizando RL e RU, com ou sem solução PVS2 nos criotubos no momento da imersão em NL (EMBRAPA Clima Temperado, Pelotas, RS, Brasil, 2021).

Tratamento	Sobrevivência			
	‘Comanche’	‘Tupy’	‘BRS Xingu’	‘BRS Caingá’
Controle (LS, PVS2; RS, MS)*	100,0 a <sup>1</sup>	100,0 a	100,0 a	94,0 a
LS, PVS2, PVS2+NL, BM, RS, MS**	22,9 c	20,0 d	17,5 c	20,0 c
LS, PVS2, RL, PVS2+NL, BM, RS, MS***	40,0 b	30,0 d	30,0 bc	32,0 c
LS, PVS2, NL, BM, RS, MS****	55,2 b	55,5 b	43,0 b	62,2 b

\*controle: LS (20 min); PVS2 (40 min); RS (20 min); MS (0,8 mg L<sup>-1</sup> BAP+ 0,1 mg L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>); \*\*LS (20 min), PVS2 (40 min), PVS2+NL, BM (45°C, 2 min), RS (20 min); MS; \*\*\*LS (20 min); PVS2 (40 min), RL (60 min) PVS2+NL, BM (45°C, 2 min), RS (20 min); MS; \*\*\*\*LS (20 min); PVS2 (40 min), RL (60 min) NL, BM (45°C, 2 min), RS (20 min); MS (0,8 mg L<sup>-1</sup> BAP+ 0,1 mg L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>);

<sup>1</sup> Médias (de cinco repetições) acompanhadas por mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) comparando os tratamentos de vitrificação com RL e RU.

Frutíferas de clima temperado, quando expostas a condições desfavoráveis como temperaturas baixas ou fotoperíodos curtos, apresentam processos fisiológicos que levam as plantas a diminuir ou cessarem seu crescimento; no entanto, as atividades metabólicas não param. Nesse período há uma necessidade de reprogramação celular, pois o amido que estava armazenado nos tecidos começa a ser degradado para aumentar a concentração de açúcares solúveis e tornar o potencial osmótico mais negativo. Esses processos são de suma importância para a

planta resistir às temperaturas frias do inverno, evitando assim o congelamento dos tecidos (TAIZ; ZEIGER, 2017). As técnicas de aclimação e pré-condicionamento são baseadas nesse fenômeno natural. O uso do pré-condicionamento em temperatura alternada (22 °C 8 h dia / -1 °C noite) mais do que dobrou a regeneração de meristemas de *Rubus* criopreservados (REED, 1988; REED; LAGERSTEDT, 1987).

No pré-condicionamento para tolerarem temperaturas baixas durante o período de inverno, ocorre aumento da concentração de açúcares, a planta perde água e diminui o ponto de congelamento dos solutos. Os efeitos benéficos do pré-condicionamento ao estresse causado pelo resfriamento em NL de plantas de clima temperado são demonstrados em várias culturas, como apresentado acima. Na cultura do morangueiro, Höfer e Reed (2011), ao testarem diferentes protocolos, verificaram que a aclimação ao frio durante 14 dias (16 h de escuro a -1 °C e 8 h de luz a 22 °C) proporcionou maior regeneração e menor variação para duas cultivares ('Aprikose' e 'Herzbergs Triumph') e três acessos de *Fragaria* (*F. corymbosum* 28, *F. gracilis* 33 e *F. moupinensis* 76), por exemplo.

A elevação do período de aclimação ao frio de uma para até 10 semanas foi benéfica para a recuperação de explantes de *Rubus* (>80%) após o RL, a taxas controladas e dependendo do genótipo (CHANG; REED, 1999). Gupta e Reed (2006) obtiveram taxas de regeneração de 40-75% utilizando a técnica de vitrificação, aplicando aos explantes LS1 (20 minutos) e ACP PVS2 (20 minutos) a 25 °C.

O pré-condicionamento a frio em meio rico em sacarose (0,3 mol L<sup>-1</sup>) mostrou-se essencial para a sobrevivência dos explantes das cultivares de amoreira-preta aqui avaliadas ('BRS Xingu', 'BRS Caingá', 'Tupy' e 'Comanche'). A aplicação de LS1 e PVS2, em temperatura de 4 °C, apresentou resultados vantajosos para as cultivares testadas, alcançando até 62% de sobrevivência para a cultivar 'BRS Caingá'.

Em meio rico em sacarose (0,3 mol L<sup>-1</sup>) ocorre aumento da estabilidade das membranas sob condições de severa desidratação, aumentando as quantidades de amido presentes nos tecidos vegetais (MATHEW et al., 2018; KULLUS; SEROCKA; MIKUŁA, 2018). Dados similares foram apresentados por Vettorazzi (2016) ao trabalhar com criopreservação de explantes de batata-doce que, com o uso de solução de sacarose a 0,3 mol L<sup>-1</sup>, verificou que somente os tratamentos controle (sem imersão em NL) sobreviveram. Para Pennycooke e Towill (2004), a eliminação da etapa de pré-cultivo em meio contendo sacarose resultou na morte de todos os explantes criopreservados. O pré-cultivo em meio contendo sacarose é essencial para

a sobrevivência dos explantes criopreservados (PENNYCOOKE; TOWILL, 2001; SAKAI; HIRAI; NIINO, 2008).

Vale destacar que em todos os tratamentos houve formação de calos. Apesar de ser um bom indicativo para a sobrevivência do material vegetal, a formação de calos pode não ser adequada para a preservação de genótipos específicos. Calos podem influenciar a viabilidade genética do material criopreservado prejudicando a identidade genética pelas variações somaclonais que podem ocorrer nas plantas regeneradas.

Em métodos de criopreservação, estresses incluindo pré-cultivo, carregamento e exposição de PVS2 podem induzir alterações epigenéticas (BEDNAREK; ORLOWSKA, 2019). O PVS2 é um osmoprotetor muito eficiente, mas a exposição prolongada dos explantes muitas vezes causa a toxicidade. Com a diminuição da temperatura da solução ocorre aumento da viscosidade e conseqüentemente a permeabilidade da solução nas células vegetais diminui. Nesse caso, a toxicidade causada pelo DMSO presente na solução afeta em menor grau os tecidos vegetais, diminuindo o estresse osmótico por excesso de desidratação e ocasionando maior porcentagem de sobrevivência após a recuperação e regeneração dos genótipos criopreservados (TEIXEIRA, 2014; DIGILIO, 2014).

Em geral, para a recuperação de genótipos de *Rubus*, todas as três técnicas principais são diretamente aplicáveis. Por exemplo, Gupta e Reed (2006), avaliando a técnica de vitrificação com carregamento em LS (90 minutos) e 180 minutos em solução de criopreservação PVS2, apresentaram média de 71% de regeneração. Wang et al., (2005), aplicando a técnica de encapsulamento-desidratação, obtiveram média de 50% de regeneração, quando desidratadas a 17% de umidade, enquanto após a aplicação da técnica de encapsulamento-vitrificação obtiveram média de 68% de regeneração com exposição a solução LS (90 minutos) e 180 minutos em PVS2.

A Figura 12 representa os resultados obtidos neste experimento. Nela são apresentadas duas parcelas de cada tratamento para cada uma das cultivares estudadas.

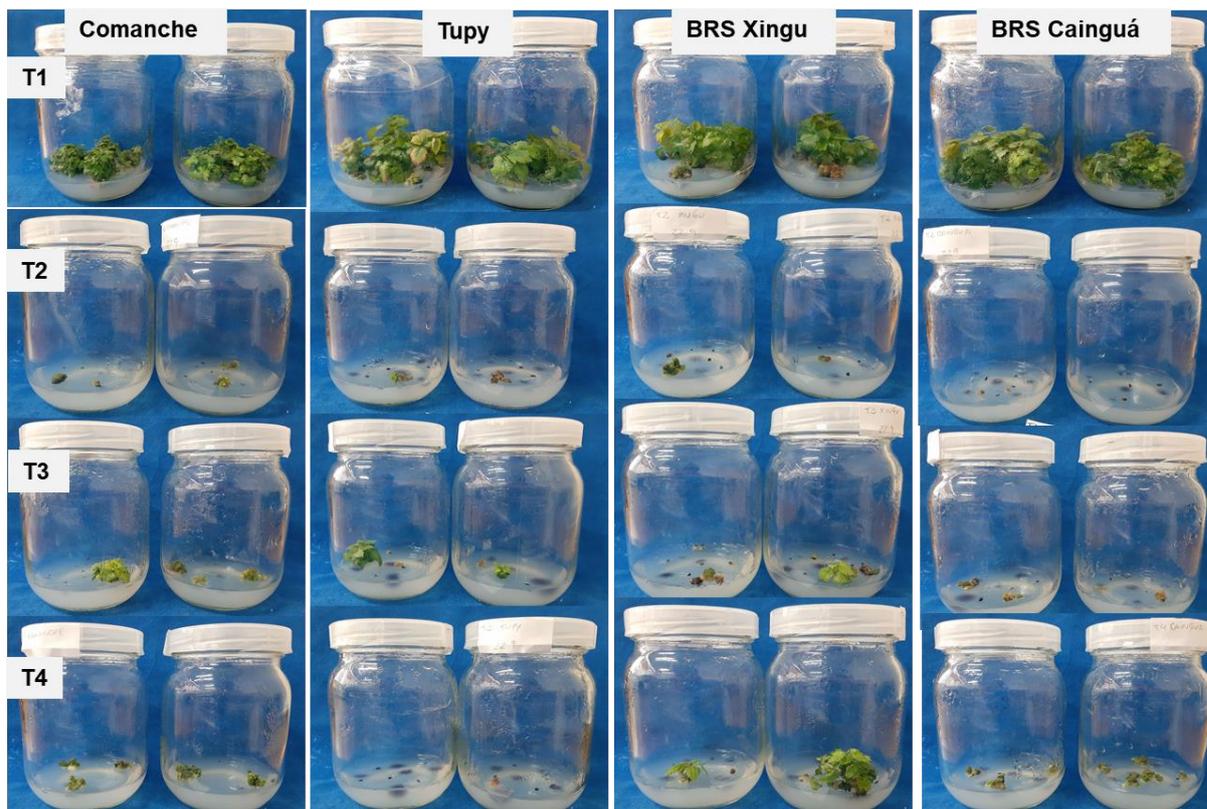


Figura 12 – Pré-condicionamento e vitrificação de cultivares de amoreira-preta ('Comanche', 'Tupy', 'BRS Xingu' e 'BRS Cainguá'), T1 - controle; T2 - LS, PVS2, NL com PVS2, BM, RS, MS; T3 - LS, PVS2, RL, NL com PVS2, BM, RS, MS; T4 – LS, PVS2, RL, NL, BM, RS, MS.  
Fonte: COPATTI, 2020.

A sobrevivência e o desenvolvimento pós-criopreservação são um desafio a ser superado; estudos demonstram que, além do estado fisiológico, das características dos explantes (tamanho e teor de água dos tecidos), a taxa de resfriamento e a tolerância ao frio podem estar envolvidas com a procedência dos genitores do material vegetal, influenciando diretamente os resultados alcançados. Em trabalhos com espécies de groselhas, pesquisadores constataram que a cultivar comercial de *Ribes nigrum* (Ben More), criada com genitores provenientes do norte da Europa, é mais tolerante ao resfriamento em comparação com *Ribes ciliatum*, espécie selvagem originária do México (BRENNAN, 1996; DUMET et al., 2000).

Ao final dos trabalhos realizados, obteve-se êxito na criopreservação de genótipos de amoreiras-pretas, alcançando níveis satisfatórios de sobrevivência (43% a 62%) aplicando-se as técnicas de vitrificação ao material. A partir da imersão em NL sem PVS2 dentro do criotubo, aliado ao pré-cultivo com temperatura alternada (0 °C noite e 20 °C dia) e pré-condicionamento em sacarose 0,3 mol L<sup>-1</sup>. Isto sugere que este tratamento, pode ser utilizado para criopreservar genótipos pertencentes ao gênero *Rubus*.

## 5 Conclusão

- Experimento 8: a criopreservação de explantes vitrificados de 'BRS Caingá' não foi possível neste experimento, não houve sobrevivência dos explantes;
- Experimento 9: para a vitrificação de 'BRS Xingu', mesmo sem imersão em NL, baixas taxas de sobrevivência foram obtidas;
- Experimento 10: a aclimação com variação de temperaturas e fotoperíodo, aliado ao uso das soluções de criopreservação em ambiente resfriado e o resfriamento lento antes da imersão em NL possibilitou a recuperação de explantes de 'Tupy' e 'BRS Xingu';
- Experimento 11: a imersão em NL sem PVS2 dentro do criotubo apresentou níveis satisfatórios de regeneração (43% a 62%), sugerindo que este tratamento, aliado ao pré-cultivo com temperatura alternada (0 °C noite e 20 °C dia) e pré-condicionamento em sacarose 0,3 mol L<sup>-1</sup>, pode ser utilizado para criopreservar genótipos pertencentes ao gênero *Rubus*.

## Considerações finais

A criopreservação pode fornecer um método de manutenção a longo prazo de baixo custo e que mantém o material genético livre dos danos edafoclimáticos ao qual os genótipos estão expostos quando mantidos em coleções *in situ* e *ex situ*. O referido método traz também, benefícios em relação aos bancos genéticos mantidos *in vitro*, pois proporciona a redução da probabilidade de variação genética devido aos frequentes subcultivos. A manutenção de duplicatas de cultivares elite ou mesmo de genótipos selvagens visa a proteção e pluralidade de genes de importância vital ao desenvolvimento de novas cultivares, aptas a sobreviverem e produzirem, diante das adversidades ambientais que possam ocorrer.

É notório que as técnicas de criopreservação podem ser aplicadas com elevada probabilidade de êxito ao gênero *Rubus*. Entretanto, por se tratar do primeiro teste realizado com genótipos de *Rubus*, que se tem notícia no Brasil, a implantação de métodos e protocolos provenientes de outros laboratórios ou centros de pesquisa pode ser desafiadora, devido às variações de equipamentos, qualidade dos reagentes, da fonte de explantes e dos genótipos e operadores de cada laboratório, entre outros.

Nos experimentos propostos neste trabalho, foi demonstrado que há variações entre as cultivares e os protocolos testados. Foi possível reunir informações durante os estudos e aplicação dos protocolos de criopreservação, em genótipos de amoreira-preta, que mostram que:

- A qualidade, a sanidade e o tempo de cultivo do material propagativo, pré-criopreservação, assim como as características pós-recuperação como a qualidade e quantidade de iluminação e a temperatura ambiental, são fundamentais ao bom rendimento das técnicas criogênicas;
- A adição de antioxidantes aos variados processos aos quais os materiais vegetais estão expostos durante a aplicação das diferentes técnicas de criopreservação, pode prevenir potenciais danos causados pelo estresse oxidativo aos tecidos vegetais;

- Há necessidade de se aprimorar períodos de tempo e temperaturas para a exposição dos explantes com as soluções crioprotetoras, evitando a ocorrência de danos aos tecidos vegetais pela exposição aos ACPs;
- O período de dessecação física se faz necessário para a técnica de encapsulamento, devendo ser mais bem compreendido se aplicado a *Rubus*;
- Há importância de treinamento de pessoal e estrutura adequada para o desenvolvimento das técnicas de criopreservação;
- Há necessidade de se obter ao menos 40% de regeneração, para o maior número possível de genótipos criopreservados, conferindo, assim, viabilidade aos protocolos;
- A possibilidade de os genótipos apresentarem variação quando imersos em NL, pode estar ligada com a genética dos parentais e sua capacidade intrínseca de condicionamento ao resfriamento.

O desenvolvimento de técnicas e protocolos eficientes de criopreservação vegetal são fundamentais para manter e conservar genótipos das mais variadas naturalidades. Além do armazenamento de germoplasma, em pequenos volumes, a manutenção da estabilidade genética por período ilimitado torna a criopreservação uma técnica das mais vantajosas e eficientes, segura e de baixo custo.

Entretanto, ainda existem lacunas significativas, em nosso entendimento, a serem superadas. Assim, são necessários esforços continuados visando compreender os efeitos conflitantes de proteção ao resfriamento e às baixíssimas temperaturas versus a toxicidade e danos resultantes dos procedimentos e técnicas de aplicação de soluções osmoprotetoras, que são necessários ao processo da criopreservação.

Ao final do ciclo de criopreservação, busca-se obter plantas completamente funcionais. Para isso elencamos a seguir algumas sugestões que podem ser seguidas possibilitando a continuidade do presente trabalho:

- Os explantes das cultivares a serem criopreservados devem ser subcultivados por até 30 dias antes da aplicação das técnicas de criopreservação, evitando-se materiais vegetais que possam estar em estresse devido ao esgotamento nutricional do meio de cultura;

- A aplicação de pré-condicionamento aos materiais a serem criopreservados deve durar ao menos 21 dias, aplicando-se temperaturas (0 e  $18\pm 2$  °C) e fotoperíodo variáveis (8 h e 16 h) nos períodos correspondentes ao 'dia' e 'noite' respectivamente;
- A desidratação e osmoproteção são imprescindíveis ao sucesso da criopreservação, devendo ser demandado o tempo necessário para a dessecação tanto física quanto osmótica dos tecidos vegetais, para que o conteúdo de água intra e extracelular seja reduzido a um nível ideal, tal que possam suportar o estresse causado pelo resfriamento em NL;
- As soluções LS, PVS2 e RS resfriadas (0-4 °C) apresentaram resultados satisfatórios quando aplicadas aos explantes das cultivares estudadas ('Comanche', 'Tupy', 'BRS Xingu' e 'BRS Caingá');
- Após a recuperação dos genótipos do nitrogênio líquido, a regeneração deve ser realizada em meio rico em sacarose, evitando-se, assim, a variação brusca do potencial osmótico dos tecidos vegetais e hidratação descontrolada dos mesmos.

## Referências Bibliográficas

ACOSTA, Y.; PÉREZ, L.; LINARES, C.; HERNÁNDEZ, L.; ESCALANTE, D.; PÉREZ, A.; ZEVALLOS, B.E.; YABOR, L.; MARTÍNEZ-MONTERO, M.E.; CEJAS, I.; ET AL. Effects of *Teramnus labialis* (L.f.) Spreng seed cryopreservation on subsequent seed and seedling growth and biochemistry. **Acta Physiology Plant**, v. 42, 2020.

ALICE LA, GOLDMAN DH, MACKLIN JA, MOORE G. *Rubus*. In: Flora of North America Editorial Committee (ed) **Flora of North América north of Mexico**, v. 9. Oxford University Press, New York, 2014. p 28–56. Disponível em: [Rubus - FNA \(floranorthamerica.org\)](http://floranorthamerica.org), acesso em 08/07/2021.

ALICE, L.A.; DODSON, T.M.; SUTHERLAND, B.L. Diversity and Relationships of Bhutanese *Rubus*. **Acta Horticulturae**, v. 777 2008, p. 63-69. Disponível em: <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2008.777.5>, acesso em 08/07/2021.

ALICE. L.A.; CAMPBELL, C.S. Phylogeny of *Rubus* (*rosaceae*) based on nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer region sequences. **Botanical Society of America**, v. 86, 1999, p. 81–97 Disponível em: <https://bsapubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2307/2656957>, acesso em 08/07/2021.

ALKEMADE, R; BAKKENES, M.; EICKHOUT, B. Towards a general relationship between climate change and biodiversity: An example for plant species in Europe. **Regional Environmental Change**, 11(SUPPL. 1), 2011, p. 143-150, doi:<http://dx.doi.org/10.1007/s10113-010-0161-1>.

ALOUFA, M. A. I et al. Multiplicação e conservação in vitro de mangabeira. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DA MANGABA, 2003, Aracaju, SE. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2003. CD-ROM

AMANO, R.; NAKAYAMA, H.; MOMOI, R.; et al. Molecular Basis For Natural Vegetative Propagation Via Regeneration In North American Lake Cress, *Rorippa Aquatica* (Brassicaceae). **Plant Cell Physiology**, v. 61, 2020, p. 353–369.

ANTONY, J.; CHANLAI, K.; RATHINAM, X.; MARIMUTHU, S.; SUBRAMANIAM, S. Effect of preculture and PVS2 incubation conditions followed by histological analysis in the cryopreserved PLBs of *Dendrobium* Bobby Messina orchid. **Australian Journal of Crop Science**, v. 5, 2011, p. 1557-1564.

ANTUNES L.E.C. Amora-preta (*Rubus* spp). **Revista Brasileira de Fruticultura** v.28: p.339-558. 2006.

ANTUNES, L.E.C.; PEREIRA, I.S.; PICOLOTTO, L.; VIGNOLO, G.K.; GONÇALVES, M.A. Produção de amoreira-preta no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, p. 100-111, 2014.

ARA, H. JAISWAL, U., JAISWAL, V.S. Synthetic seed: prospects and limitations. **Current Science**, Bangalore, v. 78, n. 12, June 1999.

BAHR, M.M.; AMER, M.S.; ABO-EL-SOUD, K.; ABDALLAH, A.N.; EL-TOOKHY, O.S. Preservation techniques of stem cells extracellular vesicles: A gate for Manufacturing of clinical grade therapeutic extracellular vesicles and long-term clinical trials. **International Journal of Veterinary Science and Medicine**, v. 8, 2020, p. 1–8. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/23144599.2019.1704992>, acesso em 15/07/2021.

BEDNAREK PT, ORŁOWSKA R. Plant tissue culture environment as a switch-key of (epi)genetic changes. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**. 2019: <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01724-1>.

BEKHEET, S.A.; SOTA, V.; EL-SHABRAWI, H.M.; EL-MINISY, A.M. Cryopreservation of shoot apices and callus cultures of globe artichoke using vitrification Method. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 18. 2020. Disponível em: [Cryopreservation of shoot apices and callus cultures of globe artichoke using vitrification method | Journal of Genetic Engineering and Biotechnology | Full Text \(springeropen.com\)](https://www.springeropen.com/doi/full/10.1186/s13007-020-00172-1), acesso em: 19/07/2021.

BENSON, E.E. Cryopreservation of phytodiversity: a critical appraisal of theory e practice. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 27, 2008, p. 141–219.

BI, W.L., PAN, C., HAO, X.Y., CUI, Z.H., KHER, M.M., MARKOVIĆ, Z., WANG, Q.C., DA SILVA, J.A.T. Cryopreservation of grapevine (*Vitis* spp.)—a review. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 53, 2017, p. 449–460.

BRENNAN, R. Currants, and gooseberries. In: JANICK, J., MOORE, J.N. **Fruit Breeding Vine and Small Berries**, v. II, Wiley, New York, 1996.

CÁCERES, N.C. Food habits and seed dispersal by the white-eared opossum, *Didelphis albiventris*, in southern Brazil. **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, v. 37, n. 2, p. 97-104, 2002.

CARPANEZZI, A.A.; ZANONA, K.; VOLTZ, R.R. **Separação botânica de espécies de *Rubus* da Região Metropolitana de Curitiba**. [recurso eletrônico] / CARPANEZZI, A.A. et al. - Colombo: Embrapa Florestas, 32 p.2019. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1107538/1/LivroDoc3261547final.pdf>, acesso em 07/07/2021.

CARRA, A.; CARIMI, F.; BETTONI, J.C.; PATHIRANA, R. Progress and challenges in the application of synthetic seed technology for ex situ germplasm conservation in grapevine (*Vitis* spp.). In: FAISAL, M.; ALATAR, A. (eds) **Synthetic seeds: germplasm regeneration, preservation and prospects**. Springer, New York, 2019, p 469–482.

CASTILLO, B.; et al. Plant regeneration from encapsulated somatic embryos of *Carica papaya* L. **Plant Cell Reports**, Berlim, v. 17, n. 3, p. 172-176, 1998.

CHANG, Y.; REED, B.M. Extended cold acclimation and recovery medium alteration improve regrowth of *Rubus* shoot tips following cryopreservation. **Cryo-Letters**, v. 20, 1999, p. 371–376.

CHAROENSUB, R.; HIRAI, D.; SAKAI, A. Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of cassava by encapsulation-vitrification method. **Cryo-Letters**, v. 25, 2004, p. 51-58.

CID, L.P.B. Sementes Sintéticas: O desenvolvimento de sementes encapsuladas. *Biotecnologia*, **Ciência & Desenvolvimento**. n.32, janeiro/junho, p.4-7, 2004.

CLARK, J. R.; FINN, C. Blackberry cultivation in the world. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. 1, p. 46-57, 2014.

COELHO, S.V.B. Tolerance of *Coffea arabica* L. seeds to subzero temperatures. **Ciência Agrotecnologia**, v. 41, 2017. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cagro/v41n3/1981-1829-cagro-41-03-00312.pdf>>, acesso em 04 de julho de 2019.

COSTA, F.H.S. et al. Efeito da interação entre carvão ativado e N6-benzilaminopurina na propagação in vitro de bananeira, cv. Grand Naine (AAA). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, n. 2, 2006, p. 280-283.

CROGE CP, CUQUEL FL, PINTRO PM, BIASI LA, BONA CM. Antioxidant Capacity and polyphenolic compounds of blackberries produced in different climates, **HortScience**, v.54, n.12, p.2209-2213, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.21273/HORTSCI14377-19>, acesso em 08/07/2021.

DIAS, M.S.C. et al. **Cultivares**. Informe Agropecuário, Belo Horizonte - Mg, v. 35, n. 279, p.39-47, 2014.

DIGILIO, A. Crioconservación de variedades nativas de *Solanum tuberosum* ssp. andigenum Juz. & Bukasov. **Master's Thesis**, Universidad Nacional de Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina, 2014. Disponível em: [\(PDF\) CRIOCONSERVACIÓN DE VARIEDADES NATIVAS DE PAPA \(researchgate.net\)](#), acesso em 15/07/2021.

DUMET, D., BLOCK, W., WORLAND, R., REED, B.M., BENSON, E.E. Profiling cryopreservation protocols for *Ribes ciliatum* using differential scanning calorimetry. **Cryo Letters**, v. 21, 2000, p. 367-378.

DUTRA, L.D.; SILVA, N.D.G.; MAYER, K.C.A.; NINO, A.F.P.; SILVA, F.O.X.; VIEIRA, F.C.B. Protocolos de Microporpropagação de Plantas II: amoreira-preta. **Documento 326**, Embrapa Clima Temperado, 2010.

EDESI, J.; TOLONEN, J.; RUOTSALAINEN, A.L.; ASPI, J.; HÄGGMAN, H. Cryopreservation enables long-term conservation of critically endangered species *Rubus humulifolius*. **Biodiversity and Conservation**, 29:303–314, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10531-019-01883-9>, acesso em 07/07/2021.

ELLIOTT, G.D.; WANG, S.; FULLER, B.J. Cryoprotectants: A review of the actions and applications of cryoprotective solutes that Modulate cell recovery from ultra-low temperatures. **Cryobiology** v. 76, 2017, p. 74–91. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0011224017301463>, acesso em: 19/07/2021.

ENGELMANN F. Plant cryopreservation: progress and prospects. **In Vitro Cellular & Developmental Biology –Plant**, v. 40, 2004, p.427–433.

ENGELMANN, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. **In Vitro Cellular & Developmental Biology –Plant**, Wallingford, v. 47, n. 1, p. 5-16, Feb. 2011.

FÁBIÁN, A.; JÄGER, K.; DARKÓ, É.; BARNABÁS, B. Cryopreservation of wheat (*Triticum aestivum* L.) egg cells by vitrification. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 30, 2008, p. 737–744. <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11738-008-0176-0>, acesso em 15/07/2021.

FAGUNDES, C.M.; MORREIRA, R.M.; RAMM, A.; SCHUCH, M.W.; TOMAZ, Z.F.P. Carvão ativado no estabelecimento in vitro de cultivares de framboeseira. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, SC, Brasil, 2017.

FENG, C.H.; LI, B.Q.; HU, L.Y.; WANG, M.R.; WANG, Q.C. A comparison of two cryogenic protocols in cryopreservation of apple shoot tips. **Acta Horticultural**, v. 1039, 2014, p. 161–166.

FINN, C. E.; CLARK, J. Blackberry. In: BADENES, M. L.; BYRNE, D. H. (Ed.). **Fruit breeding**. New York: Springer, 2012. cap. 5, p. 151-190. (Handbook of Plant Breeding, v. 8). 2012.

FORMOSO, Rafaela Silva. Conservação in vitro de amoreira-preta via crescimento lento, 2016. 53p. **Dissertação** (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas. 2016.

GONZALEZ-ARNAO, M.T. et al. Development and large scale application of cryopreservation techniques for shoot and somatic embryo cultures of tropical crops. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.92, p. 1-13. 2008.

GUERRA, M.P.; TORRES, A.C.; TEIXEIRA, J.B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa. v. 2, p. 533-568. 1999.

GUPTA, S.; REED, B.M. Cryopreservation of shoot tips of blackberry and raspberry by encapsulation-dehydration and vitrification. **Cryo letters**, v. 27, n. 1, 2006, p. 29-42. <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/summary?doi=10.1.1.534.1275>, acesso em: 13/07/2021.

HARDING, K. Genetic integrity of cryopreserved plant cells: a review. **Cryo-Letters**, v. 25, 2004, p.3–22.

HOOPER, D.U.; ADAIR, E.C.; CARDINALE, B.J.; BYRNES, J.E.K; HUNGATE, B.A.; MATULICH, K.L.; GONZALEZ, J.A.; DUFFY, E.; GAMFELDT, L.; O'CONNOR, M.L. A global synthesis reveals biodiversity loss as a major driver of ecosystem change. **Nature**, v. 486, 2012, p. 105-108. <https://doi.org/10.1038/nature11118>.

HUANG, J.-Y.; HU, J.-M. Revision of *Rubus* (Rosaceae) in Taiwan. **Taiwania**, v. 54, n. 4, p. 285-310, 2009.

HUNKOVÁ, J.; LIBIAKOVÁ, G.; GAJDOŠOVÁ, A. Shoot Proliferation Ability Of Selected Cultivars Of *Rubus* spp. As Influenced By Genotype And Cytokinin Concentration. **Journal of Central European Agriculture**, v. 17, 2016. Disponível em: <https://jcea.agr.hr/en/issues/article/1718>, acesso em 07/07/2021.

HYVÄRINEN, E.; JUSLÉN, A.; KEMPPAINEN, E.; UDDSTRÖM, A.; LIUKKO, U.M. (2019) The 2019 red list of Finnish species. Ympäristöministeriö & Suomen ympäristökeskus, Helsinki, 2019. Disponível em: [The 2019 Red List of Finnish Species: The 2019 Red List of Finnish Species — University of Helsinki](#), acesso em 07/07/2021.

IBÁÑEZ, M.A.; ALVAREZ-MARI, A.; RODRÍGUEZ-SANZ, H.; KREMER, C.; GONZÁLEZ-BENITO, M.E.; MARTÍN, C. Genetic and epigenetic stability of recovered mint apices after several steps of a cryopreservation protocol by encapsulation-dehydration. A new approach for epigenetic analysis. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 143, 2019, p. 299–307. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0981942819303328?via%3Dihub>, acesso em 15/07/2021.

ISMAYNI, L.; DESTRI, D.; SURYA, M.I. Micropropagation of *Rubus chrysophyllus* Reinw. ex Miq. and *Rubus fraxinifolius* Poir. *Journal of Tropical Life Science*. 2017, 7, 72–76. Disponível em: Micropropagation of *Rubus chrysophyllus* Reinw. ex Miq. and *Rubus fraxinifolius* Poir. | Ismaini | *Journal of Tropical Life Science*. Disponível em: <https://jtrois.ub.ac.id/index.php/jtrois/article/view/580>, acesso em 07/07/2021.

JUNGHANS, T.G; SOUZA, A.S. **Aspectos práticos da micropropagação de plantas**. 2. ed. Brasília: Embrapa. 407p. 2013.

KEFAYETI S, KAFKAS E, ERCISL S. Micropropagation of ‘Chester thornless’ blackberry cultivar using axillary bud explants. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj- napoca**. v.47, n.1, p.162-168, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.15835/nbha47111280>, acesso em 13/07/2021.

KELLER, E.R.J. (2002) cryopreservation of *Allium sativum* L. (Garlic). In: TOWILL, L.E., BAJAJ, Y.P.S. (eds) *Biotechnology in Agriculture and Forestry* 50, **Cryopresrvation of Plant germplasm II**. Springer, Berlin,2002, p. 37–47.

KELLER, E.R.J. et al., Comparing costs for different conservation strategies of garlic (*Allium sativum* L.) germoplasm in genebanks. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 60, n. 3, p. 913-926, Mar. 2013.

KIM, H.H.; CHO, E.G.; BAEK, H.J.; KIM, C.Y.; KELLER, E.R.J.; ENGELMANN, F. Cryopreservation of garlic shoot tips by vitrification: Effects of dehydration, rewarming, unloading and regrowth conditions. **Cryo Letters**, v. 25, 2004, p. 59–70. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/8669127\\_Cryopreservation\\_of\\_garlic\\_shoot\\_tips\\_by\\_vitrification\\_Effects\\_of\\_dehydration\\_rewarming\\_unloading\\_and\\_regrowth\\_conditions](https://www.researchgate.net/publication/8669127_Cryopreservation_of_garlic_shoot_tips_by_vitrification_Effects_of_dehydration_rewarming_unloading_and_regrowth_conditions), acesso em: 19/07/2021.

KIM, H.-H.; LEE, Y.-G.; PARK, S.-U.; LEE, S.-C.; BAEK, H.-J.; CHO, E.-G.; ENGELMANN, F. Development of alternative loading solutions in droplet-vitrification

procedures. **Cryo Letters**, v. 30, 2009, p. 291–299. Disponível em: [\(PDF\) Development of Alternative Loading Solutions in Droplet-Vitrification Procedures \(researchgate.net\)](#), acesso em: 19/07/2021.

KOVALCHUK, I.; TURDIEV, T.; KUSHNARENKO, S.; RAKHIMBAEV, I.; REED B.M. Cryopreservation of Raspberry Cultivars: Testing Techniques for Long-Term Storage of Kazakhstan's Kazakhstan's Plant Germplasm. **The Asian and Australasian Journal of Plant Science and Biotechnology** 4, pag.1-4. 2010. Disponível em: [http://www.globalsciencebooks.info/Online/GSBOnline/images/2010/AAJPSB\\_4\(SI1\)/AAJPSB\\_4\(SI1\)1-4o.pdf](http://www.globalsciencebooks.info/Online/GSBOnline/images/2010/AAJPSB_4(SI1)/AAJPSB_4(SI1)1-4o.pdf), acesso em: 19/07/2021.

KUHLMANN, M. **Frutos e sementes do Cerrado atrativos para fauna: guia de campo**. Brasília, DF: Rede de Sementes do Cerrado, 360 p.2012.

KULUS, D. Application of Cryogenic Technologies and Somatic Embryogenesis in the Storage and Protection of valuable Genetic Resources of Ornamental Plants. In **Somatic Embryogenesis in Ornamentals and Its Applications**; Springer: New delhi, India, 2015, p. 1–25. Disponível em: [Application of Cryogenic Technologies and Somatic Embryogenesis in the Storage and Protection of Valuable Genetic Resources of Ornamental Plants | SpringerLink](#), acesso em 19/07/2021.

KULUS, D. Managing plant genetic resources using low and ultra-low temperature storage: A case study of tomato. **Biodiversity and Conservation**, v. 28, 2019, p.1003–1027. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10531-019-01710-1>, acesso em 15/07/2021.

KULUS, D.; SEROCKA, M.; MIKUŁA, A. Effect of various preculture and osmotic dehydration conditions on cryopreservation efficiency and morphogenetic response of chrysanthemum shoot tips. **Acta Scientiarum Polonorum - Hortorum Cultus**, v. 17, 2018, p. 139–147.

KULUS, D.; SEROCKA, M.; MIKUŁA, A. Effect of various preculture and osmotic dehydration conditions on cryopreservation efficiency and morphogenetic response of chrysanthemum shoot tips. **Acta Scientiarum Polonorum - Hortorum Cultus**, v. 17, 2018, p. 139–147.

KULUS, D.; TYMOSZUK, A. Gold nanoparticles affect the cryopreservation efficiency of in vitro-derived shoot tips of bleeding heart. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**. 1–15. 2021. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11240-021-02069-4>, acesso em 15/07/2021.

KULUS, D.; ZALEWSKA, M. Cryopreservation as a tool used in long-term storage of ornamental species—A review. **Scientia Horticulturae**, v. 168, 2014, p. 88-107. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.01.014>, acesso em 15/07/2021.

LAMBARDI, M.; FABBRI, A.; CACCAVALE, A. Cryopreservation of white poplar (*Populus alba* L.) by vitrification of in vitro grown shoot tips. **Plant Cell Reports**, v.19, 2000, p. 213–218.

LEITZKE L, DAMIANI CR, SCHUCH MW. Influência do meio de cultura, tipo e concentração de citocininas na multiplicação in vitro de amoreira-preta e framboeseira. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.34, n.2, p.352-360, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542010000200012>, acesso em 08/07/2021.

LESHEN B, WERKER E, SHALEV D.P. The effect of cytokinins on vitrification in melon and carnation. *Annals of Botany*, v. 62, 1988, p. 271-6 QUOIRIN M, SILVA MC, MARTINS KG, OLIVEIRA DE Multiplication of juvenile black wattle by microcuttings. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 66, 2001, p.199-205

LI D.Z., PRITCHARD H.W. The science and economics of ex situ plant conservation. **Trends Plant Science**, v. 14, 2009, p. 614-621. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.09.005>.

LU, L.T.; BOUFORD, D.E. (2003) *Rubus*. In: WU, Z.Y.; RAVEN, P.H.; HONG, D.Y.; (eds) Flora of China, vol. 9. **Science Press**, Beijing, 2003. p 195-285.

LU, L.T.A. Study on the genus *Rubus* of China. **Acta Phytotax**, Sin 21, 1983. 13-25.

MAGYAR-TÁBORI, K., DOBRÁNSZKI, J., DA SILVA, J.A.T., BULLEY, S.M., HUDÁK, I. The role of cytokinins in shoot organogenesis in apple. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 101, 2010, p.251-267.

MANTYKA-PRINGLE, C.; MARTIN, T.G.; RHODES, J.R. (2012) Interactions between climate and habitat loss effects on biodiversity: a systematic review and meta-analysis. **Global Change Biology**. 2012. doi: 10.1111/j.1365-2486.2011.02593.x.

MARO, L.A.C.; PIO, R.; GUEDES, M.N. S.; ABREU, C.M.P.; MOURA, P.H.A. Environmental and genetic variation in the post-harvest quality of raspberries in subtropical areas in Brazil. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v.36, n.3, p.323-328, 2014.

MATHEW, L.; BURRITT, D.J.; MCLACHLAN, A.; PATHIRANA, R. Combined pre-treatments enhance antioxidant Metabolism and improve survival of cryopreserved kiwifruit shoot tips. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 138, 2019, p. 193-205. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11240-019-01617-3>, acesso em 15/07/2021.

MATHEW, L.; MCLACHLAN, A.; JIBRAN, R.; BURRITT, D.J.; PATHIRANA, R. Cold, antioxidant and osmotic pre-treatments maintain the structural integrity of meristematic cells and improve plant regeneration in cryopreserved kiwifruit shoot tips. **Protoplasma**, v. 255, 2018, p. 1065-1077.

MATSUMOTO T (2017) Cryopreservation of plant genetic resources: conventional and new methods. **Reviews in Agricultural Science**, v.5, 2017, p.13-20.

MATSUMOTO, T. Cryopreservation of plant genetic resources: conventional and new methods. **Reviews in Agricultural Science**, v. 5, 2017, p.13-20.

MAZUR, P. Principles of cryobiology. In: Fuller, B., Lane, N., Benson, E.E. (Eds.), **Life in The Frozen State**, CRC Press, London, 2004, p. 4-65.

MOHAMED-YASSEEN Y (2001) Influence of agar and activated charcoal on uptake of gibberellin and plant morphogenesis in vitro. **Cellular and Developmental Biology Plant**, 37, 2001, p.204-5.

MONTALBÁN, I.A.; OLARIETA, A.C.; CASILLAS-FIGUEROA, F.; ARELLANO-GARCÍA, M.E.; CHÁVEZ-SANTOSCOY, A.R.; PESTRYAKOV, A.; BOGDANCHIKOVA, N.; MONCALEÁN, P. Simplified Method to store embryogenic cells: Silver nanoparticles and cryoprotectors elimination effect. **Cryobiology**, v. 85, 2018, p. 134. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2018.10.067>, acesso em 15/07/2021.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A Revised Medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plant**, v. 15, 1962, p. 473–497. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>, acesso em 15/07/2021.

NADARAJAN, J.; MANSOR, M.; KRISHNAPILLAY, B.; STAINES, H.J.; BENSON, E.E.; HARDING, K. Applications of differential scanning calorimetry in developing cryopreservation strategies for *Parkia speciosa*, a tropical tree producing recalcitrant seeds. **Cryo Letters**, v. 29, 2008, p. 95–110. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18516340/>, acesso em: 19/07/2021.

NADARAJAN, J.; VAN DER WALT, K.; LEHNEBACH, C.A.; SAEIAHAGH, H.; PATHIRANA, R. Integrated ex situ conservation strategies for endangered New Zealand Myrtaceae species. **New Zealand Journal of Botany**, 2020, p. 1–18. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/0028825X.2020.1754245>, acesso em: 19/07/2021.

NAM, J.; JUNG, H.; CHOI, J.; LEE, K.; PARK, H. The anti-gastropathic and anti-rheumatic effect of niga-ichigoside F1 and 23-hydroxytormentonic acid isolated from the unripe fruits of *Rubus coreanus* in a rat model. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, 29, 967-970. 2006.

NIINO, T.; YAMAMOTO, S. Manual of Cryopreservation Methods using Cryo-plate: V and D Cryo-plate Procedure as an Effective Protocol for Cryobanks. In: Niino, T. et al. (eds.). **Plant Tissue Culture and Cryopreservation Group**, 2017, p. 16- 26.

NIINO, T.; YAMAMOTO, S.-I.; FUKUI, K.; MARTÍNEZ, C.R.C.; ARIZAGA, M.V.; MATSUMOTO, T.; ENGELMANN, F. Dehydration improves cryopreservation of Mat rush (*Juncus decipiens* Nakai) basal stem buds on cryo-plates. **Cryo Letters**, 2013, p. 549–560. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/259807940\\_Dehydration\\_Improves\\_Cryopreservation\\_of\\_Mat\\_Rush\\_Juncus\\_decipiens\\_Nakai\\_Basal\\_Stem\\_Buds\\_on\\_Cryo-plates](https://www.researchgate.net/publication/259807940_Dehydration_Improves_Cryopreservation_of_Mat_Rush_Juncus_decipiens_Nakai_Basal_Stem_Buds_on_Cryo-plates), acesso em 15/07/2021.

NISHIZAWA, S.; SAKAI, A.; AMANO, Y.; MATSUZAWA, T. Cryopreservation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) embryogenic suspension cells and subsequent plant regeneration by a simple freezing Method. **Cryo letters**, v. 13, 1992, p. 379–388. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(93\)90189-7](https://doi.org/10.1016/0168-9452(93)90189-7), acesso em 15/07/2021.

OCHATT, S.; LAMBARDI, M.; PANIS, B.; PATHIRANA, R.; MARIA ANGELES REVILLA, M.A.; WANG, Q.C. Cryopreservation, and In Vitro banking: a cool subject – Preface from the editors. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, 144, 1–5, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01985-1>, acesso em: 13/07/2021.

OLIVEIRA, R.P.de.; NINO, A.F.P. Potencial de multiplicação in vitro de cultivares de amora-preta. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 31, n. 1, p. 280-284, março, 2007.

OSZMIAŃSKI, J.; WOJDYLOO, A.; NOWICKA, P.; TELESZKO, M.; CEBULAK, T.; WOLANIN, M. Determination of phenolic compounds and antioxidant activity in leaves from wild *Rubus* Species. **Molecules**, v. 20(3), 4951-4966. 2015.

PALUDO, R. **Emater RS avalia produção de frutas na Serra gaúcha**. Ascom, Emater RS 2018. Disponível em: <https://www.estado.rs.gov.br/emater-rs-avalia-producao-de-frutas-na-serra-gaucha>.

PANIS, B.; PIETTE, B.; SWENNEN, R. Droplet vitrification of apical meristems: a cryopreservation protocol applicable to all Musaceae. **Plant Science**, v. 168, 2005, p. 45- 55.

PANIS, B.; STROSSE, H.; VAN DEN HENDE, S.; SWENNEN, R. Sucrose preculture to simplify cryopreservation of banana Meristem cultures. **Cryo Letters**, v. 23, 2002, p. 375–384

PASQUAL M. **Meios de cultura**. Lavras; UFLA/FAEPE, 74 p. 2001.

PATEL, A.V.; ROJAS-VERA, J.; DACKE, C.G. Therapeutic constituents and actions of *Rubus* species. **Current Medicinal Chemistry**, 11, 1501-1512. 2004.

PENCE, V. C. Evaluating costs for the in vitro propagation and preservation of endangered plants. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant**, Wallingford, v. 47, n. 1, p. 176-187, Feb. 2011.

PENNYCOOKE, J.C.; TOWILL, L.E. Medium alterations improve regrowth of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) shoot tips by vitrification and encapsulation-dehydration. **Cryo-Letters**, v.22, 2001, p. 381-389.

PEREIRA, J. E. S.; GUEDES, R. DA S., COSTA, F. H. DA S.; SCHMITZ, G. C. B. Composição da matriz de encapsulamento na formação e conversão de sementes sintéticas de pimenta-longa. **Horticultura Brasileira**, v.26, 2008, p.093-096.

PINHAL, H.F. et al. Aplicações da cultura de tecidos em fruteiras do Cerrado. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 7, p. 1136-1142, jul. 2011.

PITTARELLO, J.L.R.; PETREANU, M.; FILHO, V.C.; RODRIGUES, C.A. KLEIN-JÚNIOR, L.C.; NIERO, R. Extraction optimization of 5,7-Dihydroxy-6,8,4'-trimethoxyflavonol, a bioactive flavonoid from *Rubus rosifolius* (Rosaceae) leaves. **Natural Product communications**. Vol. 14 (1) 2019.

POMEISL, K.; RICHTER, J.; GOLAN, M.; KRATOCHVÍLOVÁ, I. Simple syntheses of new pegylated trehalose derivatives as a chemical tool for potential evaluation of

cryoprotectant effects on cell Membrane. **Molecules**, 25(3), 2020, p. 497. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/25/3/497#>, acesso em 15/07/2021.

PRUDENTE, D.O.; PAIVA, R. Plant cryopreservation: biochemical aspects. **Journal of Cell Development Biology**, v. 1(2), 2017.

QUOIRIN M, SILVA MC, MARTINS KG, OLIVEIRA DE Multiplication of juvenile black wattle by microcuttings. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 66, 2001, p.199-205

RASEIRA, M.C.B. et al. 2004. **Aspectos técnicos da cultura do framboeseira. Pelotas**: Embrapa Clima Temperado. 22p. (Documentos, 120).

RASEIRA, M.C.B., FRANZON, R.C., SCARANAR, C. Cultivar de Amora-preta 'BRS Xingu': Alternativa à Cultivar Brazos para o Sudeste do Brasil. **Circular Técnico 362**. Embrapa, Pelotas – RS, 2018. Disponível: [COMUNICADO-TECNICO-362.pdf](https://www.embrapa.br/comunicado-tecnico-362.pdf), acesso em 07/07/2021.

RASEIRA, M.C.B.; FRANZON, R.C.; FELDBERG, N.P.; ANTUNES, L.E.C.; SCARANAR, C. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, 20(1): e26632014, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1984-70332020v20n1c4>, acesso em 07/07/2021.

RASEIRA, M.C.B.; FRANZON, R.C.; FELDBERG, N.P.; ANTUNES, L.E.C.; SCARANAR, C. Melhoramento Genético da Amora preta na Embrapa: antes e depois da cultivar 'Tupy'. **Jornal da Fruta**. Maio de 2021. Disponível em: <http://revistadafruta.com.br/artigos-tecnicos/melhoramento-genetico-da-amora-preta-na-embrapa-antes-e-depois-da-cultivar-'Tupy',395573.jhtml>, acesso em 13/07/2021.

REDENBAUGH, K.; et al. Encapsulation of somatic embryos for artificial seed production. **In vitro cellular and development Biology – Plant**, Columbia, v. 20, n. 1, p. 256-257, Jan/Feb. 1986.

REED, B.; K. HUMMER. "Conservation of Germplasm of Strawberry (Fragaria Species)." 1995.

REED, B.D., SCHUMACHER, L., DUMET, D., BENSON, E.E. Evaluation of a modified encapsulation-dehydration procedure incorporating sucrose pretreatments for the cryopreservation of Ribes germplasm. **In Vitro Cellular e Developmental Biology - Plant**, v. 41,2005, p. 431-436.

REED, B.M. Cold acclimation as a method to improve survival of cryopreserved Rubus meristems. **Cryo-Letters**, v. 9, 1988, p. 166–171.

REED, B.M. **Plant Cryopreservation: A Practical Guide**. New York, NY: Springer. 515 p. 2008.

REED, B.M. Shoot-tip cryopreservation manual. **National Clonal Germplasm Repository Corvallis**. Corvallis, OR, USA. 2004, p. 14-17. Disponível em: <https://www.ars.usda.gov/ARSUserFiles/30120500/plantprotocols/Rubus%20cryo%202010%20corrected%20A.pdf>, acesso em 13/07/2021.

- REED, B.M. Survival of in vitro-grown apical meristems of *Pyrus* following cryopreservation. **HortScience**, v. 25, 1990, p. 111-113. Disponível em: <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.25.1.111>, acesso em: 19/07/2021.
- REED, B.M.; LAGERSTEDT, H.B. Freeze preservation of apical meristems of *Rubus* in liquid nitrogen. **HortScience**, v. 22, 1987, p. 302–303.
- REN, L.; DENG, S.; CHU, Y.; ZHANG, Y.; ZHAO, H.; CHEN, H.; ZHANG, D. Single-wall carbon nanotubes improve cell survival rate and reduce oxidative injury in cryopreservation of *Agapanthus praecox* embryogenic callus. **Plant Methods**, v. 16, 130, 2020. Disponível em: [Single-wall carbon nanotubes improve cell survival rate and reduce oxidative injury in cryopreservation of \*Agapanthus praecox\* embryogenic callus | Plant Methods | Full Text \(biomedcentral.com\)](https://doi.org/10.1186/s12874-020-00711-1), acesso em 15/07/2021.
- RICHARDS, A.J.; KIRSCHNER, J.; STEPANEK, J.; MARHOLD, K. Apomixis And Taxonomy: An Introduction. **Folia Geobotanica Phytotaxon** 31:281–282. 1996. <https://doi.org/10.1007/BF02815372>, acesso em 08/07/2021.
- ROQUE-BORDA, C.A., KULUS, D., SOUZA, A.V.; KAVIANI, B.; & VICENTE, EF. Cryopreservation of Agronomic Plant Germplasm Using Vitrification-Based Methods: An Overview of Selected Case Studies. **International Journal of Molecular Science**. 2021, 22, 6157. <https://doi.org/10.3390/ijms22116157>.
- RUTA, C.; LAMBARDI, M.; OZUDOGRU, E.A. Biobanking of vegetable genetic resources by in vitro conservation and cryopreservation. **Biodiversity and Conservation**, 29. 2020, 3495–3532.
- SAIPRASAD, G.V.S. Artificial seeds and their applications. **Resonance**, Bangalore, v.6, n.5, 2001, p.39- 47.
- SAKAI A., HIRAI D., NIINO T. Development of PVS-Based Vitrification and Encapsulation–Vitrification Protocols. In: Reed B.M. (eds) **Plant Cryopreservation: A Practical Guide**. Springer, New York, NY. 2008. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-72276-4\\_3](https://doi.org/10.1007/978-0-387-72276-4_3).
- SAKAI, A.; KOBAYASHI, S.; OIYAMA, I. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. **Plant Cell Reports**, v. 9, 1990, p. 30–33. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00232130>, acesso em: 15/07/2021.
- SALGADO, A.R. Applying molecular and phenotypic tools to characterize flesh texture and acidity traits in the Arkansas Peach Breeding Program and understanding the crispy texture in the Arkansas Blackberry breeding program. 2016. 375 f. **Tese** (Ph.D. in Horticulture) – University of Arkansas.
- SANTOS, P.A.A.; PAIVA, R.; SILVA, L.C.; SOUZA, A.C.D.; SANTANA, M.C.D.; SILVA, D.P.C.D. Cryopreservation of the mangaba tree (*Hancornia speciosa* Gomes): a protocol for long-term storage. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 37, 2015, p. 289–296.
- SCHIEHLA, M.; FRANÇA, T.O.; BIASI, L.A. Adequação de protocolo para cultivo in vitro de amoreira-preta (*Rubus* sp.) BRS ‘Xingu’. **Journal of Biotechnology and**

**Biodiversity**, v.8, n.2, 2020. Disponível em: [Periódicos - UFT](#), acesso em 07/07/2021.

SCHULZ, M.; SERAGLIO, S.K.T.; BETTA, F.D.; NEHRING, P.; VALESE, A.C.; DAGUER, H.; GONZAGA, L.V.; COSTA, A.C.O.; FETT, R. Blackberry (*Rubus ulmifolius* Schott): Chemical composition, phenolic compounds and antioxidant capacity in two edible stages. **Food Research International**. 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31229121/>, acesso em: 19/07/2021.

SHISHOVA, N.V.; DAVYDOVA, G.A.; KOMBAROVA, N.A.; DAVYDOVA, I.B.; POLTAVTSEV, A.M.; ZARAIKY, E.I.; POLTAVTSEVA, R.A. The use of nanosized liposomes from vegetable phospholipids in combination with albumine and some polysaccharides as cryoprotective agents in the course of cryopreservation. **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**, v. 747. 2020, 012074. Disponível em: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1757-899X/747/1/012074> acesso em 15/07/2021.

SINGH, S.K.; RAI, M.K.; ASTHANA, P.; SAHOO, L. Alginate-encapsulation of nodal segments for propagation, short-term conservation and germplasm exchange and distribution of *Eclipta alba* (L.). **Acta Physioly Plant**; 32:607–10, 2010.

SIRIWOHARN, T.; WROLSTAD, R.E.; FINN, C.E.; PEREIRA, C.B.; SOUZA, F.V.D. et al., Criopreservação de germoplasma de abacaxi pela técnica de vitrificação em gotas. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2019. 28 p.: il. (**Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Mandioca e Fruticultura, ISSN 1809-5003; 95**). Publicação disponibilizada on-line no formato PDF. <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1103477/criopreservacao-de-germoplasma-de-abacaxi-pela-tecnica-de-vitrificacao-em-gotas>. Acesso em 28 de junho de 2019.

SNIR, I. Red Raspberry (*Rubus idaeus*). In **Crops II. Biotechnology in Agriculture and Forestry**; Bajaj, Y.P.S., Ed.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, v. 6, 2011. p. 124–141. ISBN 978-3642735226.

SOUZA, F.V.D. et al. Droplet-vitrification and morphohistologicas studies of cryopreserved shoo tips of cultivated and wild pineapple genotypes. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 124, 2016, p. 351-360.

SOUZA, R.S. Características de produção e qualidade de frutas de genótipos de amoreira-preta em sistema de produção orgânico. 2018. 79f. **Dissertação** (Mestre em Ciências) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS, 2018.

SPEECKAERT, G.; BORGES, A.V.; GYPENS, N. Salinity and growth effects on dimethylsulfoniopropionate (DMSP) and dimethylsulfoxide (DMSO) cell quotas of *Skeletonema costatum*, *Phaeocystis globosa* and *Heterocapsa triquetra*. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v.226, 2019, 106275. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2019.106275>, acesso em: 15/07/2021.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MØLLER, I.M.; MURPHY, A. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal** [recurso eletrônico]; tradução: MASTROBERTI, A.A. et al.]; revisão técnica: OLIVEIRA, P. L. – 6. ed. – Porto Alegre: Artmed, 2017.

TANAKA, D.; NIINO, T.; UEMURA, M. Cryopreservation of Plant Genetic Resources. In **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1081. Springer: New York, NY, USA, 2018, p. 355–369. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30288719/>, acesso em: 19/07/2021.

TANNER, J.D., CHEN, K.Y., JENDEREK, M.M., WALLNER, S.J., MINAS, I.S. Determining the effect of pretreatments on freeze resistance and survival of cryopreserved temperate fruit tree dormant buds. **Cryobiology**, v. 13, 2021: doi: 10.1016/j.cryobiol.2021.05.003.

TEIXEIRA, A.S., GONZÁLEZ-BENITO, E.M.; MOLINA-GARCÍA, A.D. Glassy State and Cryopreservation of Mint Shoot Tips. **Biotechnology Progress**, v. 29, 2013, p. 707–717. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23436805/>, acesso em 15/07/2021.

TEIXEIRA, A.S.; FALTUS, M.; ZÁMECNÍK, J.; GONZÁLEZ-BENITO, M.E.; MOLINA-GARCÍA, A.D. Glass transition and heat capacity behaviors of plant vitrification solutions. **Thermochimica Acta**, v. 593, 2014, p. 43–49 Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tca.2014.08.015>, acesso em: 15/07/2021.

TOLENTINO, F.; ARAUJO, P.A.; MARQUES, E.S.; PETREANU, M.; ANDRADE, S.F.; NIERO, R.; PERAZZO, F.F.; ROSA, P.C.P.; MAISTRO, E.L. In vivo evaluation of the genetic toxicity of *Rubus niveus* Thunb (*Rosaceae*) extract and initial screening of its potential chemoprevention against doxorubicin-induced DNA damage. **Journal of Ethnopharmacology**, 164, 89-95. 2015.

TRIBESS, B.; PINTARELLI, G.M.; BINI, L.A.; CAMARGO, A.; FUNEZ, L.A.; GASPER, A.L.; ZENI, A.L.B. Ethnobotanical study of plants used for therapeutic purposes in the Atlantic Forest region, Southern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, 164, 136-146. 2015.

UCHENDU, E.E.; MUMINOVA, M.; GUPTA, S.; REED, B.M. Antioxidant and anti-stress compounds improve regrowth of cryopreserved *Rubus* shoot tips. **In Vitro Cellular e Developmental Biology – Plant**, v. 46, 2010, p. 386-393. <https://www.jstor.org/stable/40793161>.

UKHATOVA, Y.V.; DUNAEVA, S.E.; ANTONOVA, O.Y.; APLIKOVA, O.V.; POZDNIKOVA, K.S.; NOVIKOVA, L.Y.; SHUVALOVA, L.E.; GAVRILENKO, T.A. Cryopreservation of red raspberry cultivars from the VIR in vitro collection using a modified droplet vitrification method. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, V. 53, 2017, p. 394–401. Disponível em: [Cryopreservation of red raspberry cultivars from the VIR in vitro collection using a modified droplet vitrification method | SpringerLink](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30288719/), acesso em: 13/07/2021.

VELLEND, M.; DORNELAS, M.; BAETEN, L.; BEAUSÉJOUR, R.; BROWN, C.D.; DE FRENNE, P.; ELMENDORF, S.C.; GOTELLI, N.J.; MOYES, F.; ISLA H. MYERS-SMITH, I.H.; MAGURRAN, A.E.; MCGILL, B.J.; HIDEYASU SHIMADZU, H.; SIEVERS, C. Estimates of local biodiversity change over time stand up to scrutiny. **Ecology**, v. 98(2), 2017, p. 583–590. [Estimates of local biodiversity change over time stand up to scrutiny \(uvm.edu\)](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30288719/).

VETTORAZZI, R.G. Caracterização, Estabelecimento In Vitro E Criopreservação De Variedades Locais De Batata-Doce (*Ipomoea batatas* L. Lam) **Dissertação** Campos dos Goytacazes – RJ, 2016.

VILLA. F.; ARAÚJO, A.G.; PIO, L.A.S. PASQUAL, M. Multiplicação in vitro da Amoreira-preta 'Ébano' em diferentes concentrações de meio MS e BAP. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, n. 3, p. 582-589, 2005. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542005000300011>.

VIZZOTTO, M.; RASEIRA, M.C.B.; PEREIRA, M.C.; FETTER, M.R. Teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante em diferentes genótipos de amoreira-preta (*Rubus* sp.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.34, n.3, p.853-858, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452012000300027>, acesso em 08/07/2021.

VOLK, G.M.; OLMSTEAD, J.W.; FINN, C.E.; JANICK, J. The ASHS outstanding fruit cultivar award: a 25-year Retrospective. **Hortscience**, Alexandria, v. 48, n. 1, p. 4-12, 2013.

VOLK, G.M.; SHEPHERD, A.N.; BONNART, R. Successful Cryopreservation of Vitis Shoot Tips: Novel Pre-treatment Combinations Applied to Nine Species. **Cryo Letters**, v. 39, 2018, p. 322-330. (ISSN: 0143-2044).

VOLK, G.M.; WALTERS, C. Plant vitrification solution 2 lowers water content and alters freezing behavior in shoot tips during cryoprotection. **Cryobiology**, v. 52, 2006, p. 48–61. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16321367/>, acesso em: 19/07/2021.

VOZOVYK, K.; BOBROVA, O.; PRYSTALOV, A.; SHEVCHENKO, N.; KULESHOVA, L. Amorphous state stability of plant vitrification solutions. **Biologija**, v. 66, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.6001/biologija.v66i1.4190>, acesso em 15/07/2021.

WANG, B.; LI, J.W.; ZHANG, Z.B.; WANG, R.R.; MA, Y.L.; BLYSTAD, D.R.; KELLER, E.R.J.; WANG, Q.C. Three vitrification-based cryopreservation procedures cause different cryo-injuries to potato shoot tips while all Maintain genetic integrity in regenerants. **Journal of Biotechnology**, v. 184, 2014, p. 47-55. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.04.021>, acesso em: 19/07/2021.

WANG, J.H.; BIAN, H.W.; ZHANG, Y.X.; CHENG, H.P. The dual effect of antifreeze protein on cryopreservation of rice (*Oryza sativa* L.) embryogenic suspension cells. **Cryo Letters**, v. 22, 2001, p. 175–182. Disponível em: [The dual effect of antifreeze protein on cryopreservation of rice \(\*Oryza sativa\* L.\) embryogenic suspension cells - PubMed \(nih.gov\)](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11751367/), acesso em 15/07/2021.

WANG, M.R.; LAMBARDI, M.; ENGELMANN, F.; PATHIRANA, R.; Panis, B.; Volk, G.M.; Wang, Q.C. Advances in cryopreservation of in vitro-derived propagules: technologies and explant sources. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 144, 2021, p. 7–20. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01770-0>.

WANG, Q. C. et al. Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of grapevine by encapsulation-dehydration. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 63, 2000, p. 41-46.

WANG, Q.; TANNE, E.; ARAV, A.; GAFNY, R. Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of grapevine by encapsulation-dehydration. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 63, 2000, p. 41–46. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1006411829738>, acesso em 15/07/2021.

WANG, Q.C.; LAAMANEN, J.; UOSUKAINEN, M.; VALKONEN, J.P.T. Cryopreservation of in vitro grown shoot tips of raspberry (*Rubus idaeus* L.) by encapsulation-vitrification and encapsulation-dehydration. **Plant Cell Reports**, v. 24, p 280–288 2005. Disponível em: [Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of raspberry \(Rubus idaeus L.\) by encapsulation–vitrification and encapsulation–dehydration | SpringerLink](https://doi.org/10.1007/s11627-005-0028-0), acesso em: 13/07/2021.

WEBER, H.E. Former And Modern Taxonomic Treatment Of The Apomictic *Rubus* Complex. **Folia Geobotanica Phytotaxon** 31:373–380. 1996. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF02815381>, acesso em 08/07/2021.

WOHNHAAS, C.T.; LEPARC, G.G.; FERNANDEZ-ALBERT, F.; KIND, D.; GANTNER, F.; VIOLLET, C.; HILDEBRANDT, T.; BAUM, P. dMSO cryopreservation is the Method of choice to preserve cells for droplet-based single-cell RNA sequencing. **Scientific Reports**, v. 9, 2019, p. 1–14. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-019-46932-z>, acesso em: 15/07/2021.

WOWK, B. Thermodynamic aspects of vitrification. **Cryobiology**, v. 60, 2010, p. 11–22.

XIAN-HUA, X.; XIN-MAO Z.; MENG L.; BO XU; HENG-NING DENG; QI YU; XIN-FEN GAO. **Plant Systematics and Evolution**. 2019. 305:705–716. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00606-019-01600-7>, acesso em 08/07/2021.

YAMAMOTO, S.; RAFIQUE, T.; PRIYANTHA, W.S.; FUKUI, K.; MATSUMOTO, T.; NIINO, T. Development of a cryopreservation procedure using aluminium cryo-plates. **Cryo Letters**, v. 32, 2011, p. 256–265. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/51499339\\_Development\\_of\\_a\\_Cryopreservation\\_Procedure\\_Using\\_Aluminium\\_Cryo-plates](https://www.researchgate.net/publication/51499339_Development_of_a_Cryopreservation_Procedure_Using_Aluminium_Cryo-plates), acesso em 15/07/2021.

YIH HUANG, J., E MING HU, J. 2009. Review of *Rubus* (Rosaceae) in Taiwan. **Taiwania**, v. 54 (4): p 285-310.2009. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/268287745\\_Revision\\_of\\_Rubus\\_Rosaceae\\_in\\_Taiwan](https://www.researchgate.net/publication/268287745_Revision_of_Rubus_Rosaceae_in_Taiwan), acesso em 07/07/2021.

YOON, J.W.; KIM, H.H.; CHO, E.G.; KO, H.C.; HWANG, H.S.; PARK, Y.E.; ENGELMANN, F. Cryopreservation of cultivated and wild potato varieties by droplet vitrification procedure. **Acta horticulturae**, v. 760, 2007, p. 203–208. Disponível em: [https://www.ishs.org/ishs-article/760\\_26](https://www.ishs.org/ishs-article/760_26), acesso em 15/07/2021.