



Universidade do Estado do Rio de Janeiro  
Centro Biomédico  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Aline Medeiros Saavedra de Paula

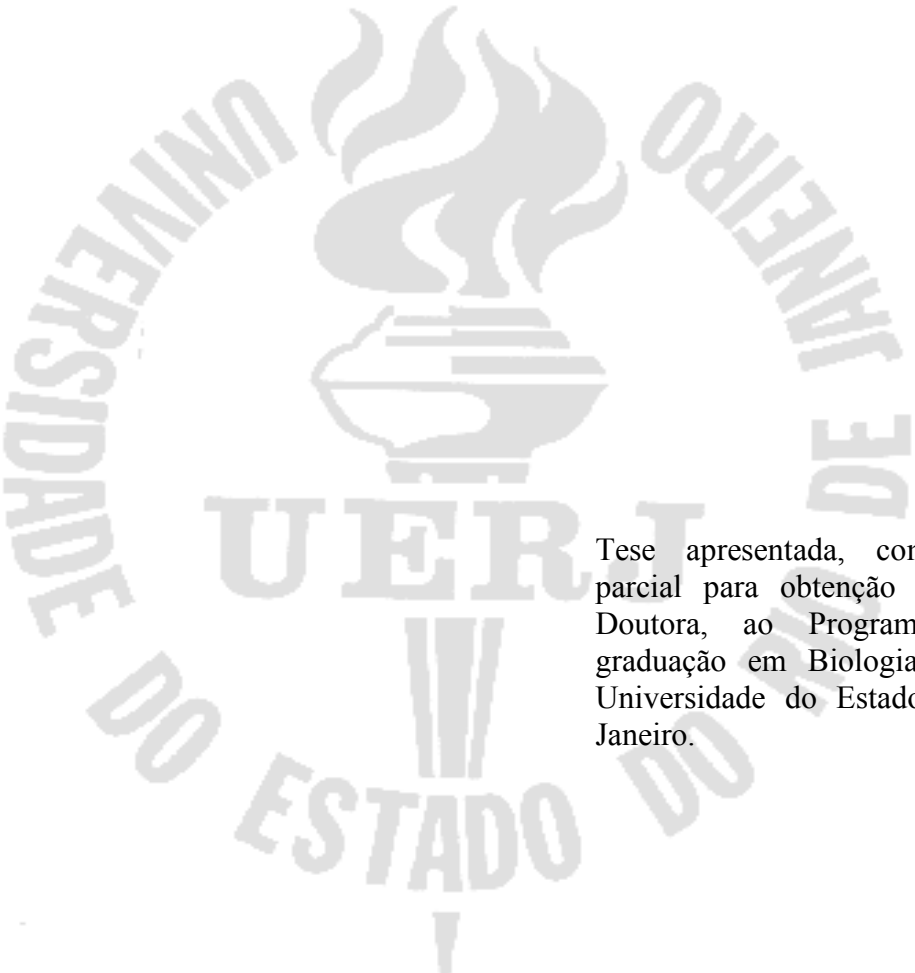
**Criopreservação e avaliação da capacidade biossintética de  
*Hovenia dulcis* Thunb. (Rhamnaceae)**

Rio de Janeiro

2022

Aline Medeiros Saavedra de Paula

**Criopreservação e avaliação da capacidade biossintética de  
*Hovenia dulcis* Thunb. (Rhamnaceae)**



Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora, ao Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Claudia Simões Gurgel

Coorientadoras: Prof.<sup>a</sup> Dra. Norma Albarello

Prof.<sup>a</sup> Dra. Livia da Silva Cordeiro

Rio de Janeiro

2022

## CATALOGAÇÃO NA FONTE

UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CTC-A

S112 Saavedra, Aline Medeiros.  
Criopreservação e avaliação da estabilidade biossintética de *Hovenia dulcis* Thunb. (Rhamnaceae)/ Aline Medeiros Saavedra de Paula. – 2022.  
120 f. : il.

Orientadora: Claudia Simões Gurgel.  
Coorientadoras: Norma Albarello, Livia da Silva Cordeiro  
Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes.

1. Plantas medicinais - Teses. 2. Plantas medicinais - Propagação-in-vitro - Teses. I. Gurgel, Claudia Simões. II. Albarello, Norma. II. Cordeiro, Livia da Silva. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 633.88

Patricia Bello Meijinhos CRB7/5217 - Bibliotecária responsável pela elaboração da ficha catalográfica

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

---

Assinatura

---

Data

Aline Medeiros Saavedra de Paula

**Criopreservação e avaliação da capacidade biossintética de  
*Hovenia dulcis* Thunb. (Rhamnaceae)**

Tese apresentada, como requisito para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 19 de maio de 2022

Banca examinadora:

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Claudia Simões Gurgel

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Georgia Pacheco Peters de Almeida

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

---

Prof. Dr. Jean Carlos Bettoni

The New Zealand Institute for Plant and Food Research Limited

---

Prof. Dr. Marco Eduardo do Nascimento Rocha (FIOCRUZ)

Far-Manguinhos - Fundação Oswaldo Cruz

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Renata de Oliveira Garcia

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Rio de Janeiro

2022

## **DEDICATÓRIA**

Dedico esse trabalho às minhas orientadoras,  
Claudia Simões Gurgel, Livia da Silva Cordeiro,  
Norma Albarello e a bióloga Thais Athayde.  
Sem vocês nada disso seria possível.

## AGRADECIMENTOS

Normalmente agradecimentos são feitos em tópicos, um texto normatizado, engessado e pontual. Peço desculpas aos mais tradicionais, mas o meu agradecimento será em um formato diferente. Isso porque meu doutorado caiu em uma época diferente. Época de geração de vida em meu ventre, época de nascimento de um pedacinho de mim, época de perdas, época de pandemia.

Resolvi, então, agradecer primeiramente à vida. Agradecer por estarmos vivos, e por poder compartilhar meus sentimentos com todos que se interessarem pelo nosso trabalho. Digo nosso, com toda a significância da palavra, porque contei com a ajuda de muitas pessoas, de forma prática, de forma sentimental, na forma de acolhimento, e por vezes, as pessoas participaram como ouvintes, para que eu, simplesmente, pudesse desabafar. E por isso resolvi citar poucos nomes, porque tenho certeza de que cada ser vivo importante em minha vida e em minha jornada acadêmica, sentirá, em seu coração, que todo o texto é destinado a ele.

Agradeço à minha família, por ter me proporcionado conforto, oportunidades e afeto, mesmo quando as minhas crenças não eram compatíveis com as deles.

Aos amigos que me inspiram todos os dias. Dos quais eu tenho muito orgulho da trajetória.

Aos meus amigos de Labplan, que vivenciaram todos os meus dias como doutoranda, que me apontaram caminhos, compartilharam conhecimento, dividiram oportunidades, discutiram artigos, ou mesmo tomaram um café compartilhando um bolo (Aaaaa, boa época em que podíamos compartilhar comida e afeto sem culpa).

Amigos esses, que gostaria aqui de frisar, que não são meros amigos de laboratório, se tornaram a minha segunda família, se tornaram amigos de vida.

Tháís, Lívia, obrigada por não terem soltado a minha mão durante a minha licença, por terem cuidado tão bem daquelas vidas que são nossos objetos de trabalho. Eu não tenho palavras para agradecer por não terem deixado o nosso trabalho, literalmente, morrer.

Às minhas orientadoras, além de entrarem em tudo que já foi citado, eu gostaria de agradecer por terem acreditado em mim, quando nem eu mesma acreditei.

Maria Flor, obrigada por ser exatamente quem você é. E me fazer florescer como pessoa todos os dias da  
minha vida.

E por fim, gostaria de agradecer ao PGBV/UERJ, por possibilitar a realização deste trabalho, à FAPERJ, pelos recursos que financiaram o projeto e à CAPES que me proporcionou bolsa durante todo o período do meu doutorado.

Obrigada UERJ, por ter se tornado a minha casa.

Não sei se a vida é curta ou longa para nós, mas sei que nada do que vivemos tem sentido, se não tocarmos o coração das pessoas. Muitas vezes basta ser: colo que acolhe, braço que envolve, palavra que conforta, silêncio que respeita, alegria que contagia, lágrima que corre, olhar que acaricia, desejo que sacia, amor que promove. E isso não é coisa de outro mundo, é o que dá sentido à vida. É o que faz com que ela não seja nem curta, nem longa demais, mas que seja intensa, verdadeira, pura enquanto durar. Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina

*Cora Coralina*

## RESUMO

SAAVEDRA, A. M. **Criopreservação e avaliação da capacidade biossintética de *Hovenia dulcis* Thunb. (Rhamnaceae)**. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022

*Hovenia dulcis* é uma espécie arbórea que vem sendo objeto de estudos biotecnológicos devido às suas propriedades medicinais, como as atividades hepatoprotetora e antineoplásica. Protocolos de micropropagação, calogênese e suspensões celulares já foram estabelecidos para a espécie. Considerando que o material mantido *in vitro* está sujeito a contaminações e perda do seu potencial morfo genético a criopreservação, que consiste no armazenamento de material biológico a temperaturas ultrabaixas com o uso de nitrogênio líquido (NL), tem sido indicada como um método seguro para a conservação de germoplasma em longo prazo. Este trabalho teve como objetivos desenvolver um protocolo de criopreservação para ápices caulinares de *H. dulcis*, empregando a técnica de V-Crioplaca, assim como avaliar a manutenção da capacidade de produção de metabólitos secundários do material criopreservado. Plantas propagadas *in vitro* mantidas em meio de cultura Murashige e Skoog (MS) suplementado com 0,5 mg L<sup>-1</sup> de benzilaminopurina (BA) + 0,5 mg L<sup>-1</sup> de cinetina (KIN) foram usadas como fontes de explantes para os ensaios de criopreservação. Ápices caulinares excisados de microestacas desenvolvidas por 3 semanas em cultivo, forneceram explantes para os ensaios de criopreservação. Adicionalmente, o melhor protocolo encontrado para ápices excisados de microestacas foi também testado para ápices excisados diretamente das plantas matrizes. Os ápices foram pré-tratados em meio MS contendo 0,3 M de sacarose por 24 h e, em seguida, foram aderidos às crioplacas utilizando soluções de alginato de sódio e cloreto de cálcio. Posteriormente, os ápices foram expostos à solução a base de glicerol e sacarose (solução de osmoproteção ou *loading*) por 20 min em temperatura ambiente e, finalmente, à solução de vitrificação de plantas número 2 (PVS2) a 0°C por diferentes tempos (0, 15, 30, 60, 90, 120, 150 min), antes do armazenamento em NL. Para o reaquecimento, as crioplacas foram transferidas para solução de reaquecimento (*unloading*: 1,2 M sacarose) por 20 min em temperatura ambiente. Após a criopreservação, os ápices foram removidos das crioplacas e inoculados no meio MS contendo a associação de BA e KIN, em igual concentração, (0,2 ou 0,5 mg L<sup>-1</sup>). Adicionalmente, foi avaliado o uso de papel de filtro sobre o meio de cultura como base para a inoculação dos ápices durante a primeira semana de recuperação após a criopreservação. As culturas foram gradativamente expostas à luz, até completarem 1 mês após o processo criogênico. A eficiência da criopreservação foi avaliada com base na sobrevivência (após 4 semanas) e recuperação (após 8 semanas) dos ápices caulinares criopreservados. Ápices caulinares expostos em longos tempos de incubação ao PVS2 (90; 120 min) resultaram no aumento das taxas de recuperação. A concentração de citocininas no meio de recuperação influenciou a regeneração dos ápices após a criopreservação. As taxas mais elevadas de regeneração (63%) foram encontradas em meio de cultura MS suplementado com a combinação de BA e KIN (0,5 mg L<sup>-1</sup>) em associação ao uso de papel de filtro sobre o meio de recuperação. Foram alcançadas taxas de sobrevivência e de recuperação de 68% e 63%, respectivamente para ápices oriundos de microestacas, enquanto para ápices obtidos diretamente das plantas matrizes esses valores foram de 75% e 45%, respectivamente. As plantas regeneradas a partir dos ápices criopreservados apresentaram características fenotípicas semelhantes às propagadas *in vitro*, demonstrando a eficiência do protocolo de criopreservação de ápices de *Hovenia dulcis* pela técnica de V-Crioplaca. As análises por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) revelaram a ocorrência de perfis fitoquímicos similares entre materiais oriundos de plantas *in vitro* e folhas de plantas de campo, sugerindo que o processo de criopreservação não acarretou em alterações na capacidade biossintética das plantas.

Palavras-chave: CLAE. Cultivo *in vitro*. Planta medicinal. V-Crioplaca. Uva-do-Japão.



## ABSTRACT

SAAVEDRA, A. M. **Cryopreservation and evaluation of biosynthetic capacity of *Hovenia dulcis* Thunb. (Rhamnaceae)** Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

*Hovenia dulcis* is a woody species that has been subjected to several biotechnological studies due to its medicinal properties, such as hepatoprotective and antineoplastic effects. Protocols of micropropagation, callogenesis, cell suspension and compact callus clusters cultures have already been established for the species. However, the material maintained in active growth under *in vitro* conditions is vulnerable to contamination and loss of its morphogenetic potential. Therefore, the cryopreservation, which consist of storing biological material at ultra-low temperatures using liquid nitrogen (LN), has been applied for the long-term conservation of germplasm. This study aims to develop a cryopreservation protocol for shoot tips of *H. dulcis*, using the V Cryo-plate technique, as well as to evaluate the maintenance of secondary metabolites production in the cryopreserved material. *In vitro* propagated plants maintained on MS medium supplemented with  $0.5 \text{ mg.L}^{-1}$  kinetin (KIN) +  $0.5 \text{ mg.L}^{-1}$  benzylaminopurine (BA) were used as source of explants. The experiments were carried out using shoot tips excised from microcuttings cultured from *in vitro*-grown stock plants. In addition, the most suitable cryopreservation protocol was also evaluated using shoot tips excised directly from axillary shoots of stock plants. The shoot tips were pre-treated on medium containing high concentration of sucrose (0.3 M) for 24 h, and they were adhered to the cryo-plates using the solutions of sodium alginate and calcium chloride. The shoot tips were exposed to loading solution (20 min) at room temperature and then to PVS2 at  $0^{\circ}\text{C}$  for different times (0, 15, 30, 60, 90, 120, 150 min), before storage in LN. For rewarming, the cryo-plates were immersed in unloading solution (1.2 M sucrose) for 20 min at room temperature. After cryopreservation, the shoot tips were removed from the cryo-plates and transferred to MS medium containing the association of BA and KIN at the same concentration (0.2 or  $0.5 \text{ mg.L}^{-1}$ ). The use of filter paper over the culture medium for shoot tips inoculation was evaluated during the first week of recovery. The cultures were gradually exposed to light. The parameters evaluated were survival (after 4 weeks) and recovery (after 8 weeks). The longer exposure times to PVS2 resulted in increased recovery rates, highlighting the exposure to 120 minutes. The cytokinin concentration significantly affected the regeneration of shoot tips after cryopreservation. The recovery medium supplementation with BA+KIN ( $0.5 \text{ mg.L}^{-1}$  each) with filter paper allowed the highest survival (68%) and recovery (63%) rates of shoot tips from microcuttings and shoot tips excised directly from *in vitro* plants (75% survival and 45% recovery). Plants regenerated from cryopreserved shoot tips showed a normal phenotype, which confirms the efficiency of the protocol. The chromatographic analysis showed a stability in the production of secondary metabolites of plants developed from cryopreserved shoot tips and *in vitro* propagated plants suggesting that the cryopreservation process did not change plant's biosynthetic capacity.

Keywords: HPLC. *In vitro* culture. Medicinal plant. Shoot tips. V Cryo-plate.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Principais estruturas constituintes de alcaloides.....	18
Figura 2 -	Estrutura química do isopreno.....	18
Figura 3 -	Núcleo fundamental dos flavonoides e sua numeração.....	19
Figura 4 -	As principais estruturas químicas do grupo dos flavonoides.....	20
Figura 5 -	Mapa de distribuição mundial de espécies da família Rhamnaceae.....	33
Figura 6 -	Espécie <i>Hovenia dulcis</i> .....	36
Figura 7 -	Estrutura química de alguns flavonoides encontrados em <i>Hovenia dulcis</i> ...	39
Figura 8 -	Etapas do processo de criopreservação de ápices caulinares de <i>H. dulcis</i> pela técnica de V-Crioplaca.....	47
Figura 9 -	Plantas de <i>Hovenia dulcis</i> propagadas <i>in vitro</i> .....	51
Figura 10 -	Desenvolvimento de ápices caulinares de <i>Hovenia dulcis</i> criopreservados pela técnica de V-Crioplaca, após exposição à solução de PVS2 e posterior recultivo em meio MS suplementado com 0,5 mg L <sup>-1</sup> de BAP + 0,5 mg L <sup>-1</sup> de KIN.....	55
Figura 11 -	Desenvolvimento de calogênese e hiperhidricidade em ápices caulinares de <i>H. dulcis</i> submetidos ao processo de criopreservação pela técnica de V-Crioplaca após 90 dias de cultivo em meio MS suplementado com 0,5 mg L <sup>-1</sup> das citocininas BA e KIN.....	56
Figura 12 -	Desenvolvimento de ápices caulinares de <i>H. dulcis</i> criopreservados pela técnica de V-Crioplaca após exposição à solução de PVS2 e posterior recultivo em meios MS suplementado com 0,2 mg L <sup>-1</sup> de BA + 0,2 mg L <sup>-1</sup> de KIN.....	58
Figura 13-	Desenvolvimento de ápices caulinares de <i>H. dulcis</i> criopreservados pela técnica de V-Crioplaca após exposição à solução de PVS2 por 120 min e posterior recultivo sobre papel de filtro em meios MS suplementado com 0,5 mg L <sup>-1</sup> de BA + 0,5 mg L <sup>-1</sup> de KIN.....	61
Figura 14 -	Desenvolvimento de ápices caulinares de <i>H. dulcis</i> criopreservados pela técnica de V-Crioplaca e utilizando papel de filtro sobre o meio de recuperação contendo 0,2 mg L <sup>-1</sup> BA + 0,2 mg L <sup>-1</sup> KIN, após 60 dias de cultivo.....	63
Figura 15 -	Aspecto das plantas propagadas <i>in vitro</i> de <i>H. dulcis</i> mantidas em estoque após 60 dias em cultivo.....	65
Figura 16 -	Desenvolvimento de ápices caulinares excisados diretamente da planta matriz de <i>H. dulcis</i> criopreservados pela técnica de V-Crioplaca após exposição à solução de PVS2 e posterior recultivo sobre papel de filtro em meios MS suplementado com 0,5 mg.L <sup>-1</sup> de BA + 0,5 mg.L <sup>-1</sup> de KIN	66

Figura 17 - Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD-UV <sub>254nm</sub> de extratos aquosos brutos de <i>H. dulcis</i> .....	68
Figura 18 - Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD-UV <sub>340nm</sub> de extratos aquosos brutos de <i>H. dulcis</i> .....	69
Figura 19 - Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD-UV de padrão Sigma® de Ampelopsina (A) e extrato de folha de campo de <i>Hovenia dulcis</i> (B), com detalhe do espectro de UV.....	74

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Efeito da exposição à PVS2 na sobrevivência e recuperação de ápices caulinares oriundos de microestacas de <i>H. dulcis</i> , não criopreservados (NL-) e criopreservados (NL+) pela técnica de V-Crioplaca, após recuperação em meio MS suplementado com 0,5 mg L <sup>-1</sup> de BA + 0,5 mg L <sup>-1</sup> de KIN.....	54
Tabela 2 -	Efeito da exposição à PVS2 na sobrevivência e recuperação de ápices caulinares oriundos de microestacas de <i>H. dulcis</i> , não criopreservados (NL-) e criopreservados (NL+) pela técnica de V-Crioplaca, após recuperação em meio MS suplementado com 0,2 mg L <sup>-1</sup> de BA + 0,2 mg L <sup>-1</sup> de KIN.....	57
Tabela 3 -	Efeito da exposição à PVS2 na sobrevivência e recuperação de ápices caulinares oriundos de microestacas de <i>H. dulcis</i> , não criopreservados (NL-) e criopreservados (NL+) pela técnica de V-Crioplaca, após recuperação em meio MS suplementado com 0,5 mg L <sup>-1</sup> de BA + 0,5 mg L <sup>-1</sup> de KIN com adição de papel de filtro por 1 semana.....	60
Tabela 4 -	Efeito da exposição à PVS2 na sobrevivência e recuperação de ápices caulinares oriundos de microestacas de <i>H. dulcis</i> , não criopreservados (NL-) e criopreservados (NL+) pela técnica de V-Crioplaca, após recuperação em meio MS suplementado com 0,2 mg L <sup>-1</sup> de BA + 0,2 mg L <sup>-1</sup> de KIN com adição de papel de filtro por 1 semana.....	62
Tabela 5 -	Efeito da exposição à PVS2 na sobrevivência e recuperação de ápices caulinares oriundos de plantas matrizes de <i>H. dulcis</i> , não criopreservados (NL-) e criopreservados (NL+) pela técnica de V-Crioplaca, após recuperação em meio MS suplementado com 0,5 mg L <sup>-1</sup> de BA + 0,5 mg L <sup>-1</sup> de KIN com adição de papel de filtro por 1 semana.....	65

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Composição das soluções de vitrificação mais utilizadas nos processos de criopreservação vegetal.....	26
Quadro 2 -	Estudos <i>in vitro</i> de atividades biológicas com espécies da família Rhamnaceae.....	34
Quadro 3 -	Atividades biológicas a partir de estudos <i>in vitro</i> de diferentes extratos de <i>Hovenia dulcis</i> .....	40
Quadro 4 -	Método empregado nas análises por CLAE.....	49
Quadro 5 -	Espectros de absorção no UV dos sinais com as maiores porcentagens de área relativa nos cromatogramas obtidos a 340 nm de extratos de parte aérea de plantas de campo de <i>H. dulcis</i> .....	70
Quadro 6 -	Espectros de absorção no UV dos sinais com as maiores porcentagens de área relativa nos cromatogramas obtidos a 340 nm de extratos de plantas <i>in vitro</i> e de plantas recuperadas do processo de criopreservação de <i>H. dulcis</i> .....	71-72
Quadro 7 -	Comparação semiquantitativa dos sinais detectados nos cromatogramas obtidos a partir dos extratos de plantas <i>in vitro</i> de <i>Hovenia dulcis</i> .....	73

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>AIB</b> -	Ácido indolbutírico
<b>BA</b> -	6-benzilaminopurina
<b>CCD</b> -	Cromatografia em camada delgada
<b>CG-EM</b> -	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
<b>CLAE</b> -	Cromatografia líquida de alta eficiência
<b>DAD</b> -	Detector de rede de diodos
<b>DMSO</b> -	Dimetilsulfóxido
<b>ERO</b> -	Espécies reativas de oxigenio
<b>FC</b> -	Extrato de folhas de plantas de campo
<b>GA3</b> -	Ácido giberélico
<b>KIN</b> -	Cinetina
<b>MS</b> -	Meio de cultura de Murashige e Skoog, 1962
<b>MS0</b> -	Meio de cultura de Murashige e Skoog isento de reguladores de crescimento
<b>NL</b> -	Nitrogênio líquido
<b>PC</b> -	Extrato obtido de plantas oriundas do processo de criopreservação
<b>PV</b> -	Extrato obtido de plantas mantidas em estoque <i>in vitro</i>
<b>PVS2</b> -	<i>Plant Vitrification Solution 2</i>
<b>rpm</b> -	Rotação por minuto
<b>tR</b> -	Tempo de retenção
<b>UV</b> -	Ultravioleta

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
1	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	16
1.1	<b>Importância das plantas como fonte de metabólitos de interesse medicinal</b> ....	16
1.2	<b>Conservação de recursos genéticos vegetais</b> .....	20
1.2.1	<u>Técnicas de cultura de tecidos vegetais</u> .....	21
1.2.2	<u>Criopreservação</u> .....	24
1.2.2.1	Criopreservação de espécies arbóreas.....	29
1.3	<b>Avaliação da capacidade biossintética do material criopreservado</b> .....	32
1.4	<b>Família Rhamnaceae</b> .....	33
1.4.1	<u><i>Hovenia dulcis</i> Thunb.</u> .....	35
2	<b>OBJETIVOS</b> .....	42
2.1	<b>Objetivo geral</b> .....	42
2.2	<b>Objetivo específico</b> .....	42
3	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	43
3.1	<b>Material vegetal</b> .....	43
3.2	<b>Criopreservação</b> .....	44
3.2.1	<u>Preparo do material botânico e pré-cultivo dos explantes</u> .....	44
3.2.2	<u>Criopreservação pela técnica V-Crioplaca</u> .....	44
3.2.4	<u>Reaquecimento e recuperação</u> .....	45
3.3	<b>Análises estatísticas</b> .....	47
3.4	<b>Avaliação da capacidade biossintética</b> .....	48
3.4.1	<u>Material vegetal</u> .....	48

3.4.2	<u>Preparo dos extratos</u> .....	48
3.4.3	<u>Preparo dos padrões</u> .....	48
3.4.4	<u>Análise por cromatografia em fase líquida de alta eficiência (CLAE)</u> .....	48
4	<b>RESULTADOS</b> .....	50
4.1	<b>Material Vegetal</b> .....	50
4.2	<b>Criopreservação pela técnica de V-Crioplaca</b> .....	52
4.2.1	<u>Avaliação da etapa de pré-cultivo</u> .....	52
4.2.2	<u>Criopreservação de ápices oriundos de microestacas</u> .....	52
4.2.3	<u>Criopreservação de gemas axilares desenvolvidas nas plantas <i>in vitro</i></u> .....	64
4.3	<b>Avaliação da capacidade biossintética</b> .....	67
5	<b>DISCUSSÃO</b> .....	75
	<b>CONCLUSÕES</b> .....	84
	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	84
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	85
	<b>APÊNDICE</b> - Artigo publicado na revista: <i>Plant Cell Tissue and Organ Culture</i> .	106



## INTRODUÇÃO

A exploração dos recursos vegetais, especialmente o uso do extrativismo para fins medicinais, tem comprometido a sobrevivência de muitas espécies em seus habitats naturais. Além disso, no que se refere ao aproveitamento de substâncias bioativas, a variação nas concentrações devido às condições às quais as plantas estão expostas no meio ambiente, é um fator que dificulta o planejamento para exploração comercial de germoplasma de interesse. A propagação de plantas pelas técnicas de cultura de tecidos vegetais, que resulta em uma maior homogeneidade do material vegetal, tem permitido a produção *in vitro* de material botânico com fornecimento contínuo de plantas e metabólitos. Associada à produção *in vitro*, a conservação em longo prazo, que visa a manutenção da viabilidade, combinada a integridade genética do material botânico por um tempo indeterminável, alcançada ao se empregar técnicas de criopreservação, trouxe novas perspectivas para a exploração das plantas medicinais. Nesse contexto, *Hovenia dulcis* Thunb., ou popularmente chamada Uva-do-Japão, que é uma espécie arbórea originária da Ásia e introduzida no Brasil no início do século 20, tem sido estudada utilizando diferentes estratégias biotecnológicas para a sua propagação *in vitro*, o que tem demandado o estabelecimento de protocolos de conservação em longo prazo, visando assegurar a manutenção das culturas. Dessa forma, a criopreservação de ápices caulinares de plantas micropropagadas, assim como a análise da composição química das plantas desenvolvidas a partir do material criopreservado, propostas no presente estudo, irão contribuir para o conhecimento sobre a conservação da espécie, ampliando também as perspectivas da sua exploração comercial.

# 1 REVISÃO DA LITERATURA

## 1.1 Importância das plantas como fontes de metabólitos de interesse medicinal

As ações antrópicas têm causado um declínio acelerado da biodiversidade mundial, ameaçando a resiliência da natureza (VENTER et al. 2016; DUFFY et al. 2018). Esse fato tem levado ao estabelecimento de metas internacionais visando direcionar governos e sociedades em direção à conservação da biodiversidade no contexto mais amplo do desenvolvimento sustentável, como por exemplo, as ações no âmbito da Convenção sobre Diversidade Biológica (ONU, 1992) e os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ONU, 2016). Entretanto, os esforços para a conservação da biodiversidade ainda estão aquém do necessário (NICHOLSON et al., 2019), o que pode significar a perda de potenciais fontes de substâncias bioativas para a produção de medicamentos, uma vez que encontramos na natureza importante disponibilidade de química combinatória e, possivelmente, soluções para a cura de grande parte das doenças que ainda afligem a humanidade (GHORBANPOUR; VARMA, 2017).

Diversas espécies vegetais representam uma rica fonte de substâncias bioativas, muitas delas com potencial medicinal ainda desconhecido pela ciência. Várias dessas espécies têm sido usadas para tratar e prevenir distúrbios humanos, constituindo a base da medicina popular há milhares de anos (SHARMA et al., 2020). Os primeiros registros de uso de plantas medicinais são da Mesopotâmia e datam de cerca de 2600 A.C (JAMSHIDI-KIA et al., 2018). Entre as substâncias utilizadas naquele período estão os óleos essenciais de *Cupressus sempervirens* (cipreste), *Glycyrrhiza glabra* (alcaçuz), *Papaver somniferum* (papoula) e de espécies dos gêneros *Cedrus* (cedro) e *Commiphora* (mirra), todos os quais, ainda hoje, continuam sendo usados para o tratamento de diversas enfermidades (CHIVIAN et al., 2002).

As substâncias químicas sintetizadas pelos vegetais são classificadas como metabólitos primários e secundários (SIMÕES et al., 2016). Os metabólitos primários são aqueles envolvidos nos processos fisiológicos essenciais, como fotossíntese, respiração, crescimento, desenvolvimento e síntese proteica (BOURGAUD et al., 2001). Já o metabolismo secundário está relacionado a reações derivadas, muitas vezes, do metabolismo primário que dão origem a substâncias que conferem proteção e adaptação do vegetal ao seu ambiente, como defesa contra herbívoros e microrganismos, proteção contra a radiação ultra-violeta, atração de animais

dispersores de sementes e de polinizadores (GONZÁLEZ-TEUBER; HEIL, 2009). Essas substâncias, denominadas metabólitos secundários ou especiais, apresentam atividades biológicas, e têm sido utilizados no desenvolvimento de produtos farmacêuticos, nutracêuticos e agroquímicos, assim como na elaboração de fragrâncias, corantes, pigmentos e conservantes para alimentos (JIMENEZ-GARCIA et al., 2013; BAENAS et al., 2014; FAZAL et al., 2014).

Os metabólitos secundários são oriundos de diferentes vias biossintéticas, tais como: via do ácido chiquímico, via do acetato, via do mevalonato e via do fosfato de 2-metileritritol. Ainda há aqueles que são formados por via mista (SIMÕES et al., 2016; DE MOURA et al., 2019). Os produtos dessas vias são divididos em diferentes classes, algumas com grande número de substâncias e atividades biológicas relacionadas, como as classes das substâncias nitrogenadas, dos terpenoides e das substâncias fenólicas (MOHIUDDIN, 2019).

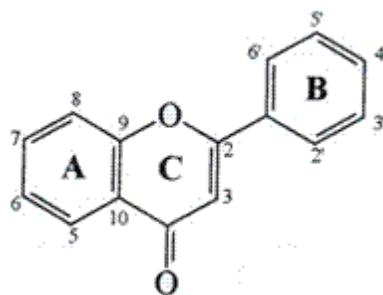
As substâncias nitrogenadas são moléculas cíclicas que contêm um átomo de nitrogênio em um estado de oxidação negativo (SIMÕES et al., 2016). Esta classe é representada por um grande número de substâncias estruturalmente muito diversas, por serem derivadas de uma combinação de moléculas oriundas de uma ou mais rotas distintas. As substâncias mais conhecidas desse grupo são os alcaloides (Figura 1), classificados de acordo com os sistemas de anéis que constituem a parte principal de suas estruturas, como indólicos, quinolínicos, isoquinolínicos, benzilisoquinolínicos, entre outros (ROBERTS; 2013). Os alcaloides podem apresentar efeitos farmacológicos relacionados ao sistema cardiovascular (ANDRAWS et al., 2005) e ao sistema nervoso central (SURH; KIM, 2010). São exemplos de alcaloides a cocaína e a cafeína, usadas como estimulantes; a morfina, utilizada como analgésico e a quinina, usada como relaxante muscular e conhecida também por sua ação anti-malária (DE OLIVEIRA; SZCZERBOWSKI, 2009; ACHAN et al., 2011; DE UGAZ, 2017).



flavonoides. Os flavonoides, são caracterizados por um esqueleto benzocromona (WINK, 2011) (Figura 3), conhecido como núcleo flavônico. Sua classificação baseia-se nas alterações no anel “C”, sendo as principais subclasses constituídas por flavonas, flavanonas, flavonois, dihidroflavonois e flavan-X-ois (Figura 4) (WANG et al., 2018). Existe ainda uma grande variedade de flavonoides sem o núcleo flavônico, como chalconas, isoflavonoides, cumestanos, antocianidinas, entre outros (MACHADO et al., 2018).

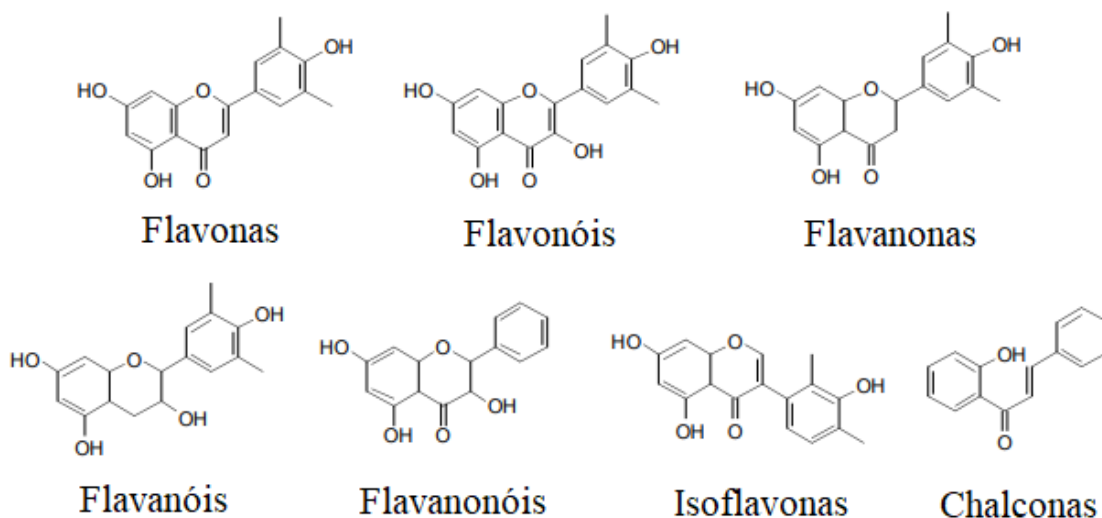
Os flavonoides são produtos de origem biossintética mista. São sintetizados através da via do ácido chiquímico e da via do acetato (SIMÕES et al., 2016). Essas substâncias possuem diversas funções nos vegetais, como proteção contra raios UV, proteção contra insetos, fungos, vírus e bactérias, e ainda como agentes alelopáticos. O interesse econômico por esta classe de substâncias decorre de suas propriedades farmacológicas, entre as quais antitumoral (XU et al., 2020), antioxidante (NARDINI; GARAGUSO, 2020), antiviral (DENARO et al., 2020), antimicrobiana (DE ARAUJO GOMES et al., 2020), anti-inflamatória (YANG, et al., 2020), fotoprotetora (MONSALVE-BUSTAMANTE et al., 2020) e antienvhecimento (CHEN et al., 2020).

Figura 3 - Núcleo fundamental dos flavonoides e sua numeração.



Fonte: SIMÕES et al., 2016.

Figura 4 - As principais estruturas químicas do grupo dos flavonoides.



Fonte: Adaptado de WANG et al., 2018.

A grande diversidade de moléculas bioativas produzidas pelas plantas tem acarretado um intenso extrativismo, resultando na perda de espécies de importância econômica e até mesmo de espécies que ainda não foram estudadas (KUMAR et al., 2020). Outras formas de ações antrópicas, que têm impactado fortemente populações vegetais, são, por exemplo, a exploração madeireira, a urbanização e a degradação de áreas selvagens para monocultura (EBRAHIMI; MOKHTARI, 2017). Dessa forma, o estabelecimento de estratégias que permitam a conservação desses recursos genéticos é de grande relevância.

## 1.2 Conservação de recursos genéticos vegetais

As estratégias que visam à conservação dos recursos vegetais são classificadas de uma forma ampla em conservação *in situ* e conservação *ex situ*. A conservação *in situ* objetiva a manutenção dos indivíduos em seu ambiente natural, o que inclui os ecossistemas, seus habitats e a manutenção ou reconstituição de populações viáveis de espécies, como é o caso das unidades de conservação (ZEGEYE, 2016). No caso de espécies domesticadas e cultivadas, a conservação *in situ* é realizada nos ambientes onde foram desenvolvidos seus caracteres distintos, sendo

denominada de conservação *on-farm* (BERGTOLD et al., 2019; VIDAL et al., 2020). Como vantagens da conservação *in situ* podem ser citadas a ampla proteção e a manutenção da vida silvestre, uma vez que ao se proteger o habitat, também se protegem espécies secundárias, viabilizando a conservação de polinizadores e dispersores de sementes, por exemplo (CLEMENT et al., 2007). Deve-se considerar, entretanto, que a conservação *in situ* exige constante monitoramento e pode requerer grandes áreas, o que nem sempre é viável. Além disso, a manutenção de uma espécie em um ou poucos locais de ocorrência não significa, necessariamente, a conservação de toda a sua variabilidade genética. Essas populações estão sujeitas a perdas por catástrofes naturais, mudanças climáticas e, muitas vezes, pela ação antrópica (CRUZ-CRUZ et al., 2013).

Por outro lado, a conservação *ex situ* visa à manutenção dos indivíduos fora de seu local de origem, normalmente em coleções biológicas, sendo assim uma estratégia complementar a outros modelos de conservação (ABELI et al., 2020). Entre as estratégias *ex situ* mais frequentemente empregadas para as espécies vegetais estão os bancos de sementes e as coleções de plantas no campo (<https://www.embrapa.br/colecoes-embrapa>). Além dessas, há também podemos citar os sistemas de conservação *in vitro*, que compreendem a manutenção do material vegetal em condições controladas, empregando-se técnicas de cultura de tecidos vegetais (GONZÁLEZ-ARNAO; ENGELMANN, 2013).

Como vantagens das estratégias de conservação que utilizam técnicas de cultura de tecidos vegetais, podem ser citadas a preservação dos recursos genéticos por longos períodos, sem a ocorrência de perdas por variações climáticas ou naturais e a necessidade de grandes espaços físicos. Já como desvantagens, podemos citar principalmente o alto custo de manutenção dos estoques, o requerimento de mão de obra especializada e condições específicas de clima e solo para a adaptação da cultura (ENGELMANN, 2013).

### 1.2.1 Técnicas de cultura de tecidos vegetais

As técnicas de cultura de tecidos vegetais consistem em um conjunto de metodologias de cultivo *in vitro* de células, tecidos ou órgãos, em condições controladas (HUSSAIN et al., 2012). Essas técnicas baseiam-se na totipotência das células vegetais, ou seja, na capacidade que as

células mantêm de regenerar um indivíduo completo, mesmo após sua diferenciação (TERMIGNONI, 2005). O cultivo *in vitro* apresenta diversas aplicações, que incluem a multiplicação de plantas em larga escala, a eliminação de vírus, o melhoramento vegetal e a produção contínua de metabólitos secundários (CANHOTO, 2010; ANASTÁCIOL et al., 2011; ABDULLAHIL et al, 2012; THORPE, 2012). As técnicas de cultura de tecidos também são ferramentas empregadas em estudos relacionados aos mecanismos moleculares, fisiológicos, bioquímicos e genéticos dos vegetais (GUERRA; NODARI, 2006).

O cultivo *in vitro* é realizado utilizando-se meios de cultura líquidos ou solidificados com um agente gelificante, como ágar e fitagel. O meio de cultura consiste em uma solução de sais minerais e vitaminas, além da adição de uma fonte de carbono, sendo mais utilizada a sacarose (COHEN; 1994). Embora existam diferentes formulações de meios de cultura, o meio estabelecido por Murashige e Skoog em 1962 (meio MS) tem sido o mais empregado. A composição do meio de cultura pode sofrer algumas modificações para atender a necessidades específicas da espécie em estudo (GEORGE, 2008). Dependendo da resposta morfogênica que se espera obter, são adicionados fitormônios ou mais frequentemente, seus análogos sintéticos, denominados fitorreguladores ou reguladores de crescimento. Essas substâncias pertencem principalmente às classes das auxinas e das citocininas e são consideradas as mais importantes para a regulação da morfogênese *in vitro* (GUERRA; NODARI, 2006).

Uma das técnicas mais utilizadas no cultivo *in vitro* é a micropropagação, que consiste na proliferação de plantas sob condições controladas e assépticas a partir de pequenos fragmentos de tecido vegetal, denominados explantes. Essa técnica permite a obtenção de clones da planta matriz, em um curto espaço de tempo e independente de variações climáticas e sazonais (TERMIGNONI, 2005).

A micropropagação pode ser alcançada por três vias principais (GEORGE et al., 2008):

- Proliferação de meristemas pré-existentes: Quando as gemas são estimuladas a se desenvolver originando novas partes aéreas ou brotos.
- Embriogênese somática: Resposta morfogênica caracterizada pelo desenvolvimento de embriões a partir de células somáticas.



- Organogênese: Que se caracteriza pela indução de gemas adventícias a partir de tecidos que apresentam potencial morfo genético, mas que em geral não se expressa na planta em condições naturais.

A embriogênese e a organogênese podem ocorrer por via direta ou indireta. Na via direta, as células do explante são induzidas à desdiferenciação celular, seguido do processo de rediferenciação, dando origem a embriões somáticos (embriogênese) ou partes aéreas e/ou raízes (organogênese). Na via indireta, as células do explante passam pelo processo de desdiferenciação e, em seguida, por uma fase com intensa proliferação celular, resultando em uma massa de células desorganizadas denominada de calo, que pode sofrer rediferenciação ou manter-se na condição de células desorganizadas (PHILLIPS; GARDA, 2019).

Além da regeneração de plantas, os calos podem ser utilizados para o estabelecimento de culturas de células em suspensão, que consistem em células individuais ou agregados celulares cultivados em meio líquido e mantidos sob agitação para fornecer aeração adequada. Esses sistemas são muito utilizados para a produção de metabólitos *in vitro* (GUERRA; NODARI, 2006).

Outras técnicas empregadas no cultivo vegetal *in vitro* são as culturas de órgãos, nas quais se preserva a estrutura básica do explante inicial, com um crescimento organizado que pode ser continuamente mantido. São exemplos de culturas de órgãos as culturas de raízes e as culturas de brotos (GEORGE et al., 2008), que podem ser utilizadas na produção *in vitro* de plantas e de metabólitos secundários (ALSOUFI et al., 2019; KAPOOR et al., 2019).

Uma das vantagens do estabelecimento *in vitro* é a possibilidade de obtenção, de forma contínua e controlada, de material botânico e de metabólitos de interesse, permitindo o cultivo em qualquer época do ano, independentemente de condições ambientais, e sem a necessidade de extrativismo no ambiente natural (ROUTA et al., 2000). Essas características mostram-se muito importantes uma vez que o cultivo em condições de campo está sujeito a variações climáticas e sazonais, ao ataque de patógenos, assim como à própria ação antrópica, o que muitas vezes dificulta a produção de material com qualidade e quantidade necessárias para atender a diferentes demandas. Dessa forma, a produção *in vitro* também contribui para a manutenção das espécies em seu habitat natural (DANIELL et al., 2001).

A manutenção das culturas *in vitro* normalmente requer subcultivos periódicos. Assim, as culturas são mantidas em crescimento ativo, o que as torna mais propensas a contaminações e à perda ou redução de seus potenciais morfogenético e biossintético, pela possibilidade de ocorrência de variações somaclonais, que são definidas como quaisquer variações de natureza genética ou epigenética decorrentes do processo de cultivo *in vitro* (BELOKUROVA, 2010; ADU-GYAMFI et al., 2016). Esses eventos podem ser atenuados se o material for mantido em crescimento lento, sistema que é estabelecido pela modificação das condições de ambiente de cultivo (fatores físicos), da composição do meio de cultura (fatores químicos) ou pela combinação de ambos, sendo possível reduzir a velocidade do crescimento *in vitro* e, conseqüentemente, a frequência de manipulação (subcultivo) das culturas (ENGELMANN, 1991). Contudo, a conservação em longo prazo é a forma mais eficiente de manutenção sob condições *in vitro* e pode ser alcançada através da criopreservação.

### 1.2.2 Criopreservação

A criopreservação consiste na manutenção do material biológico em nitrogênio líquido (NL) a  $-196^{\circ}\text{C}$  ou em sua fase de vapor a  $-150^{\circ}\text{C}$ , possibilitando a conservação por um período de tempo indeterminado, uma vez que acarreta a interrupção dos processos fisiológicos e bioquímicos do material conservado (SAKAI; ENGELMANN, 2007). Além de proteger o germoplasma de alterações genéticas, também preserva o potencial regenerativo do material, sem a preocupação com o tempo de armazenamento e requer um espaço físico extremamente reduzido em relação a outros procedimentos de conservação vegetal (PANIS, 2018).

A primeira questão a ser considerada no estabelecimento de um protocolo de criopreservação de uma espécie é a escolha do material que será utilizado. Diversos tipos de materiais têm sido conservados por esse método, como sementes (VETTORAZZI et al., 2019), grãos de pólen (LI et al., 2019), gemas dormentes (RANTALA et al., 2019), ápices caulinares (VIANNA et al., 2019), segmentos de raízes (YANG et al., 2019), calos (MARTINEZ-MONTERO et al., 2020), suspensões celulares, entre outros (SOLLIMAN et al., 2019). Normalmente, são priorizados materiais que contenham tecidos meristemáticos, tornando a regeneração após a criopreservação mais viável, já que esses tecidos têm como características

uma alta capacidade proliferativa e a presença de células pouco vacularizadas, permitindo uma taxa de desidratação mais homogênea quando comparado a células de tecidos já diferenciados.

Outro importante aspecto a ser considerado para a eficiência dos protocolos de criopreservação é sua capacidade de induzir a desidratação do material vegetal, uma vez que as moléculas de água, ao serem expostas a temperaturas extremamente baixas, se arranjam em forma ordenada, dando origem a cristais de gelo (BENELLI, 2021). A estrutura desses cristais pode ocasionar injúrias nas paredes celulares e nas membranas das organelas, levando ao extravasamento de conteúdo e, dependendo das dimensões dos danos, desencadear a morte celular. Entretanto, a desidratação deve ser realizada de forma gradual, com o intuito de manter o conteúdo hídrico estrutural das células (MATSUMOTO, 2017).

À medida que ocorre a desidratação, o meio intracelular se torna viscoso e altamente concentrado, e ao ser superresfriado, o conteúdo celular passa do estado líquido para um estado semissólido e amorfo, denominado estado vítreo (BENSON, 2008). Esse processo, conhecido como vitrificação, restringe a mobilidade das moléculas de água remanescentes, evitando a formação de cristais de gelo durante o armazenamento a baixas temperaturas (BENSON et al., 2008). Além da vitrificação do meio intracelular, altas velocidades de resfriamento e reaquecimento também dificultam a formação de cristais de gelo e são fundamentais para o sucesso de procedimentos de criopreservação (PANIS, 2018).

Os protocolos de criopreservação são constituídos por diferentes etapas que visam à desidratação gradativa dos materiais biológicos antes de sua imersão em NL. Normalmente, caracterizam-se por uma etapa de pré-tratamento em meio de cultura com alta osmolaridade, sendo mais frequentemente suplementado com sacarose em concentrações de 0,3 M até 1 M (BETTONI et al., 2021). Na etapa seguinte pode ser utilizada a solução de osmoproteção (2,0 M de glicerol; 0,4 M de sacarose) (NISHIZAWA et al., 1993), que contribui para a desidratação do material e tem função de osmoproteção (SAKAI, 2008).

Ainda antes da imersão em NL, o material a ser criopreservado pode passar por etapa de desidratação evaporativa, quando é exposto à sílica gel ou à ventilação em capelas de fluxo laminar (PANIS, 2018); ou por mais uma etapa de desidratação osmótica, com o emprego de substâncias crioprotetoras específicas como a solução de vitrificação de plantas número 2 (PVS2) e a solução de vitrificação de plantas número 3 (PVS3) (ZAMECNIK et al., 2021). Alguns

exemplos de agentes crioprotetores são: dimetilsulfóxido (DMSO), etilenoglicol (EG), propilenoglicol e glicerol. Esses agentes apresentam uma alta velocidade de penetração, uma vez que possuem baixo peso molecular e grande capacidade de ultrapassar a membrana plasmática (JAIN; PAULSON, 2006). Além de prevenir a formação de cristais de gelo, e proteger contra possíveis danos causados pela desidratação e pelo resfriamento, o DMSO e o glicerol também contribuem com ação de capturar radicais livres, o que os confere ação antioxidante (CHETVERIKOVA, 2012; NOOR et al., 2019). Também são empregados como agentes crioprotetores, substâncias como a sacarose, sorbitol, trealose, a polivinilpirrolidona (PVP), o óxido de polietileno e o hidroxietilamido, esses crioprotetores apresentam uma velocidade de penetração menor, tendo uma ação, principalmente, na proteção do material ao induzir a desidratação por diferença de osmolaridade com o meio extracelular (BENSON, 2008). Essa resposta se assemelha com a resposta fisiológica observada em plantas adaptadas a climas frios, onde a mudança de temperatura ativa um mecanismo de defesa de acúmulo de solutos, protegendo naturalmente as células (YUANYUAN et al., 2009).

Alguns estudos mencionam que os açúcares presentes nas soluções crioprotetoras são fundamentais para manter a integridade das membranas celulares, desempenhando papel na manutenção estrutural da bicamada lipídica, em níveis baixos de hidratação, a partir da formação de mais ligações de hidrogênio, evitando assim a ruptura ou deformidade das membranas, tanto durante a desidratação, quanto durante o resfriamento (ZAMECNIK et al., 2021). Também atuam reduzindo o ponto de fusão do meio intracelular (TURNER et al., 2001; TOLDI et al., 2009).

As substâncias crioprotetoras podem ser utilizadas isoladamente ou em combinação, constituindo as chamadas soluções de vitrificação. Dentre essas se destacam as chamadas *Plant Vitrification Solutions* (PVSs) que diferem entre si de acordo com o tipo e a concentração de seus componentes (Quadro 1).

Quadro 1 – Composição das soluções de vitrificação mais utilizadas nos processos de criopreservação vegetal.

Solução	DMSO (%)	Etilenoglicol (%)	Glicerol (%)	Sacarose (%)	Referência
PVS1	15	15	30	5	URAGAMI et al., 1989
PVS2	15	15	30	14	SAKAI; KOBAYASHI; OIYAMA, 1990
PVS3	–	–	50	50	NISHIZAWA et al., 1993
PVS4	–	20	35	20	SAKAI, 2000
VSL	10	10	10	45	LIU et al., 2004

Assim como o resfriamento em NL é precedido por uma série de etapas que visam preparar de forma gradativa o material para ser exposto a temperaturas ultrabaixas, o reaquecimento também requer cuidados que são cruciais para o sucesso dos protocolos de criopreservação (BENSON, 2008). Essa etapa deve ser realizada de forma rápida, para evitar a formação de cristais de gelo, que podem causar injúrias e comprometer a recuperação do material. Normalmente, os protocolos de criopreservação incluem a imersão do material em banho-maria por 1 a 2 min, a temperaturas de 39 °C - 40 °C. Além disso, antes de ser inoculado no meio de recuperação, o material é previamente exposto à chamada solução de reaquecimento (*unloading*) que tem como base o meio de cultivo padrão da espécie contendo uma concentração elevada de sacarose (1,2 M). Essa etapa tem como objetivo evitar um choque osmótico, resultante da diferença entre os potenciais osmóticos do meio intracelular do material criopreservado e o meio de cultura no qual o material será inoculado (GONZALEZ-ARNAO et al., 2008; SAKAI et al., 2008).

Diferentes técnicas de criopreservação têm sido desenvolvidas para plantas. Nos primeiros protocolos, a desidratação do material era realizada por meio do resfriamento lento do explante, utilizando equipamentos chamados de refrigeradores programáveis (PANIS, 2018). Esse resfriamento provoca a formação de gelo no meio extracelular, causando uma diferença de pressão de vapor entre os ambientes intra e extracelular, que induz à saída da água das células e torna o meio interno mais concentrado (BENSON, 2008). Ao atingir a temperatura de -40 °C, o material é imerso em NL (ENGELMANN, 2011). Essa técnica normalmente é mais eficiente para a criopreservação de tecidos indiferenciados, como é o caso de calos e suspensões celulares (CRUZ-CRUZ et al., 2013). O resfriamento lento, também é uma técnica eficiente para

criopreservação de plantas de climas frios, porém, não se mostra eficaz para a maior parte das espécies tropicais, uma vez que essas não possuem estratégias fisiológicas naturais de proteção para o frio intenso (GERY et al., 2011).

Trabalhos iniciados a partir da década de 1980 concentraram-se em desenvolver procedimentos criogênicos que eliminassem a necessidade do uso de resfriadores programáveis (SAKAI; ENGELMANN, 2007). Dessa forma, foram desenvolvidos protocolos baseados no chamado resfriamento rápido, nos quais a desidratação, antes da imersão em NL, é alcançada pela exposição do material biológico a soluções crioprotetoras ou por desidratação física, seja pela exposição à sílica gel ou ao fluxo de ar. Esses trabalhos resultaram no estabelecimento das técnicas de dessecação, vitrificação (SAKAI et al., 1990), encapsulamento-desidratação (DEREUDDRE; FABRE, 1990), encapsulamento-vitrificação (MATSUMOTO et al., 1995) e de vitrificação em gotas (PANIS et al., 2005). Mais recentemente, tem sido adotado o uso de placas de alumínio nas diferentes etapas do procedimento, dando origem às técnicas de vitrificação em crioplaca (V-Crioplaca) (YAMAMOTO et al., 2011) e dessecação em crioplaca (D-Crioplaca) (YAMAMOTO et al., 2011).

A técnica de dessecação baseia-se na redução do conteúdo hídrico do material sob fluxo de ar ou pela exposição à sílica gel por períodos pré-determinados (GONZALEZ-ARNAO et al., 2014), enquanto a técnica de vitrificação envolve a desidratação pelo tratamento dos explantes com soluções de altas concentrações osmóticas (SAKAI et al., 1990). Essas técnicas associadas ao prévio encapsulamento do material biológico em cápsulas de alginato de cálcio, recebem a denominação de encapsulamento-desidratação e encapsulamento-vitrificação. O encapsulamento tem como principais vantagens a facilidade no manuseio dos explantes e sua proteção (BEN-AMAR et al., 2013), uma vez que o material não é exposto diretamente às soluções de vitrificação, nem à desidratação evaporativa.

Outra técnica, muito utilizada para a criopreservação de diversas espécies, como por exemplo de banana, batata doce e uva (PANIS et al., 2005; SAKAI; ENGELMANN, 2007), é a vitrificação em gotas ou do inglês *droplet vitrification*, que tem como maior diferença para as outras técnicas o uso de um pedaço de folha de alumínio (5 x 20 mm) como suporte para os explantes. O material é tratado com solução crioprotetora e disposto sobre a folha com uma pequena gota da solução crioprotetora que irá englobar o explante. Posteriormente, essa folha de

alumínio contendo os explantes envoltos na solução crioprotetora é imersa diretamente em NL (SAKAI; ENGELMANN, 2007). Como vantagem dessa técnica, temos a manipulação de mais de um explante por vez e taxas mais altas de resfriamento e reaquecimento do material, causada pelo contato direto com a folha de alumínio. Entretanto, como o material não está aderido a folha de alumínio, ocorrem muitas vezes perdas dos explantes dentro das soluções, ao longo do protocolo de criopreservação (WANG et al., 2021).

As técnicas mais recentemente desenvolvidas utilizam suportes de placas de alumínio para aderência do material a ser criopreservado. Os materiais são fixados às crioplacas com auxílio das soluções de alginato de sódio e cloreto de cálcio. Quando associada à técnica de vitrificação, denomina-se vitrificação em crioplaca (V-Crioplaca). Já quando associada à técnica de dessecação, denomina-se dessecação em crioplaca (D-Crioplaca). O uso das crioplacas confere importantes vantagens ao processo de criopreservação, como a maior velocidade de resfriamento e reaquecimento devido à alta condutividade térmica do alumínio. Adicionalmente, facilita o manuseio dos explantes e permite uma maior agilidade aos procedimentos, evitando a perda de explantes nas soluções, ou mesmo danos físicos causados pela manipulação direta (YAMAMOTO et al., 2011). Os protocolos desenvolvidos com essas técnicas têm se mostrado muito eficientes, alcançando significativas taxas de recuperação dos materiais criopreservados, quando comparados aos resultados obtidos empregando-se as técnicas de vitrificação, dessecação e encapsulamento-vitrificação, por exemplo (YAMAMOTO et al., 2011; DHUNGANA et al., 2017; PETTINELLI et al., 2017; VILARDO et al., 2019b).

Outra técnica que utiliza um suporte metálico para a aderência do material vegetal, e que foi recentemente desenvolvida, é a *Crio-mesh* ou Crio-malha (FUNNEKOTTER et al., 2017). A principal diferença entre a crio-malha e a crioplaca é que o material do suporte utilizado é um pequeno retângulo de malha de aço inoxidável (FUNNEKOTTER et al., 2017), podendo ser utilizada como alternativa às crioplacas de alumínio.

Os avanços nas tecnologias de criopreservação são de especial importância para as espécies arbóreas, surgindo como abordagem complementar à conservação *in situ*, especialmente devido à possibilidade de redução das áreas necessárias para o cultivo e dos custos, em comparação com os métodos tradicionais de conservação (LAMBARDI; SHAARAWI, 2016).

### 1.2.2.1 Criopreservação de espécies arbóreas

As espécies arbóreas são altamente afetadas por diversos fatores naturais como variações climáticas severas, erupções vulcânicas e tornados por exemplo, além de também serem afetadas pelas ações antrópicas, sendo utilizadas como fontes de uma das matérias primas naturais mais antigas já registradas (a madeira) e serem retiradas das áreas naturais para darem mais espaço para criação de gado e de plantações.

Ainda que essas espécies sejam desimadas da natureza, elas também tem espaço dentro da exploração comercial, sendo utilizadas na produção de alimentos (como os frutos) e na indústria farmacêutica, como fonte de substâncias de interesse (AUGUSSEAU et al., 2006). A exploração dessas espécies pode acarretar o comprometimento de populações naturais, como ocorreu com *Taxus brevifolia*, em função da extração do alcaloide taxol, uma substância com alta atividade antineoplásica. A espécie quase foi extinta, uma vez que para a obtenção de cerca de um quilo de taxol, são necessárias cascas de mais de 1.000 árvores, com uma idade de maturação considerável (BROWER, 2008). Como principal forma de conservação das espécies arbóreas, nos temos as conservações *in situ*, como a criação de parques nacionais com territórios de grande extensões. Entretanto, esse tipo de metodologia de conservação, enfrenta grandes limitações uma vez que necessita de fiscalização, e políticas públicas funcionais.

Em função da importância econômica dessas espécies, o desenvolvimento de estratégias de conservação em longo prazo, com destaque para a criopreservação torna-se bastante relevante. Entretanto, as espécies arbóreas, na maioria dos casos, têm características que dificultam sua produção, mesmo por cultivo *in vitro*. Alguns desses aspectos são a presença de sementes recalcitrantes, dificuldade de rizogênese *in vitro*, contaminação endógena e crescimento lento devido ao longo ciclo de vida (RATHORE et al., 2004).

Técnicas de criopreservação já foram estabelecidas para algumas árvores frutíferas, como pereira, macieira e caqui, tanto empregando protocolos clássicos de resfriamento lento (CHANG, 2000), como por técnicas baseadas no resfriamento rápido, como encapsulamento-desidratação (NIINO; SAKAI, 1992), vitrificação (NIINO; SAKAI, 1992), vitrificação em gotas (NIU et al., 2012) e D-Crioplaca (MATSUMOTO et al., 2015). A criopreservação também tem



sido utilizada para fins de eliminação de patógenos em arbóreas, a chamada crioterapia (UNDP et al., 2007).

A crioterapia é um método biotecnológico, utilizado para eliminar patógenos em espécies vegetais, principalmente vírus. Ela se baseia nas diferenças fisio-anatômicas entre as células que constituem o domo meristemático e as demais células vegetais. As células meristemáticas por não serem alcançadas pelos feixes vasculares estão isentas de contaminação viral, uma vez que esses patógenos se movimentam pelo corpo da planta através dos vasos condutores. Além disso, as células meristemáticas são constituídas por pequenos vacúolos. Dessa forma, as células vegetais infectadas ao serem expostas às temperaturas ultrabaixas, não conseguem se recuperar, uma vez que por apresentarem um grande conteúdo hídrico estão sujeitas à formação de cristais de gelo em seu interior e, conseqüentemente, a ocorrência de injúrias em suas membranas. Por outro lado, as células meristemáticas, por sua estrutura formada por poucos e pequenos vacúolos, são mais resistentes ao processo criogênico. Dessa forma, com a sobrevivência apenas de células meristemáticas, a planta regenerada após o processo de crioterapia estará livre de patógenos (BETTONI et al., 2016).

A conservação por criopreservação também já foi utilizada para espécies madeireiras como para o eucalipto, onde foi utilizada a técnica de encapsulamento-desidratação foi empregada na conservação de gemas axilares (PÁQUES et al., 2002). Protocolos baseados no resfriamento lento foram estabelecidos para gemas dormentes de bétula de prata, que é uma arbórea utilizada na medicina tradicional (RYYNÄNEN, 1996). , enquanto a vitrificação foi usada para ápices e gemas axilares de um híbrido de Aspen, que se trata de uma espécie arbórea pioneira, muito importante para restaurar áreas degradadas (JOKIPII et al., 2004).

Considerando as espécies lenhosas tropicais, o estabelecimento de protocolos de criopreservação apresenta maiores desafios, uma vez que estas espécies não têm mecanismos fisiológicos prévios para passar por estações mais frias, o que faz com que elas sejam espécies ainda mais sensíveis aos processos de criopreservação (NOOR et al., 2019). Lenhosas tropicais são principalmente propagadas por sementes, as quais são sensíveis ao frio ou à dessecação. As técnicas normalmente utilizadas para a criopreservação dessas espécies são as de armazenamento de embriões ou eixos embrionários, como já reportado para seringueira (NORMAH et al., 1986), jaqueira (THAMMASIRI, 1999) e coqueiro (YOBOUE et al., 2014; SAJINI et al., 2006). No

entanto, existem espécies não passíveis de serem criopreservadas a partir de embriões, seja devido ao grande tamanho dessas estruturas, como no caso de *Durio zibethinus* L., ou mesmo pela ausência de embriões diferenciados em suas sementes, como em *Garcinia gummi-gutta* (NOOR et al., 2016).

Durante as diferentes etapas de procedimentos de criopreservação, os tecidos vegetais são expostos a diversas condições de estresse. O próprio processo de excisão dos propágulos as etapas de desidratação e as variações de temperatura durante o resfriamento e reaquecimento do material são eventos que podem acarretar injúrias irreversíveis aos tecidos e desencadear a morte celular (UCHENDU et al. 2010). Alguns desses eventos podem, ainda, induzir variações epigenéticas e somáticas (LARKIN; SCOWCROFT, 1981; HAZUBSKA-PRZYBYŁ; DERING, 2017). Dessa forma, torna-se importante que junto ao desenvolvimento de protocolos de criopreservação também sejam estabelecidas metodologias para avaliar o material vegetal quanto à manutenção das características das plantas matrizes. Nesse sentido, têm sido empregadas metodologias que utilizam marcadores moleculares para avaliação da estabilidade genética (IBÁÑEZ et al., 2019; SADAT-HOSSEINI et al., 2019), além da análise de descritores morfológicos (TOWILL, 1983; KULUS et al., 2019; WANG et al., 2021) e avaliações citológicas (GAUTIER et al., 2019), bioquímicas (ANTONY et al., 2019; ACOSTA et al., 2020) e da capacidade biossintética do material (MARCO-MEDINA et al., 2013; SHAHBAZI et al., 2019).

### **1.3. Avaliação da capacidade biossintética do material criopreservado**

A manutenção da capacidade de síntese de metabólitos secundários é uma característica essencial para a determinação da eficiência de protocolos de criopreservação de plantas medicinais (ENGELMANN; TAKAGI, 2000; WANG et al., 2021). Nos últimos anos, tem sido observado o crescimento do número de estudos que avaliam a criopreservação de culturas *in vitro* de plantas medicinais, sob o aspecto da manutenção da capacidade biossintética de metabólitos de interesse (GEORGIEVA et al., 2014; KULUS, 2020). Para isso, são utilizados diferentes métodos cromatográficos, incluindo a Cromatografia em Camada Delgada (CCD), a

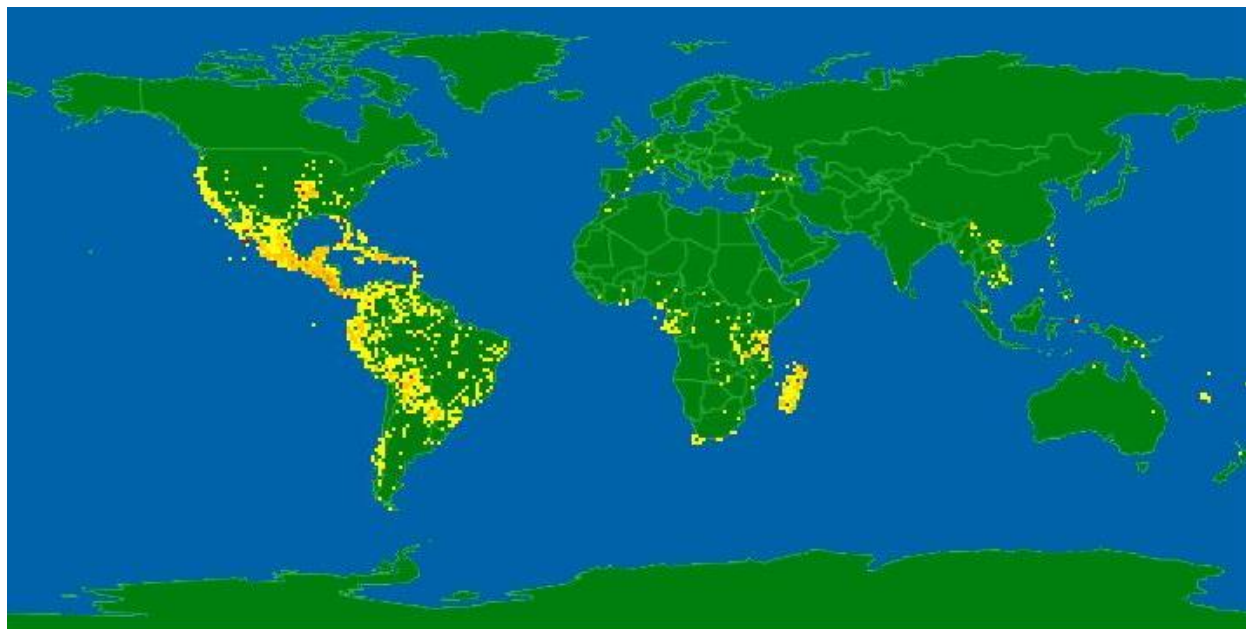
Cromatografia em Fase Gasosa (CG) e a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Essas técnicas permitem obter informações sobre os constituintes de extratos vegetais e servem para direcionar as operações de fracionamento, visando ao isolamento de substâncias de interesse.

Ponderando a relevância dessas metodologias na pesquisa de plantas medicinais e na exploração de metabólitos secundários, muitas têm sido empregadas nos estudos de substâncias bioativas produzidas *in vitro* (PAEK et al., 2005), com destaque para a CLAE, técnica físico-química de separação de substâncias utilizada em análises qualitativas e/ou quantitativas (TONHI et al, 2002). Como exemplos do uso de técnicas cromatográficas na análise de materiais pré- e pós-criopreservação, podemos citar os estudos de Ahuja e colaboradores (2002) que empregaram a CLAE para avaliar a capacidade de produção de metabólitos de *Dioscorea floribunda*, após a criopreservação de ápices caulinares pela técnica de vitrificação e o uso da CG em culturas de células em suspensão de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh, sendo observado um perfil fitoquímico similar entre os materiais a partir da avaliação de 14 diferentes metabólitos secundários da espécie (OGAWA et al., 2008).

#### 1.4 Família Rhamnaceae

A família Rhamnaceae, pertencente à ordem Rosales, apresenta cerca de 900 espécies, que incluem árvores, arbustos e lianas (MEDAN et al., 2004). As ramnáceas têm distribuição cosmopolita, sendo encontradas em regiões temperadas, tropicais e subtropicais (Figura 5) (MEDAN et al., 2004). As espécies dessa família têm tendência a ser xeromórficas, ou seja, a adaptar-se facilmente a climas semiáridos, desérticos ou de regiões úmidas, com alta salinidade, como os manguezais, o que favorece sua ocorrência em habitats mais secos. Raven e Axelrod (1974) consideraram que as ramnáceas estão bem representadas em regiões tropicais e temperadas, e amplamente distribuídas e adaptadas, que se torna difícil traçar a história natural da família.

Figura 5 - Mapa de distribuição mundial de espécies da família Rhamnaceae.



Legenda: Mapa divulgado em <http://www.tropicos.org/Name/42000237?tab=maps> (acesso em: 01/03/2022 - Missouri Botanical Garden). Pontos amarelos representando a distribuição das espécies.

Algumas espécies de Rhamnaceae são utilizadas na medicina tradicional, como *Ziziphus jujube* (SOLLOZO-DUPONT et al., 2011), *Z. mauritiana* (DIALLO et al., 2010) e *Hovenia dulcis* (HYUN et al., 2010), o que justifica os estudos farmacológicos que vêm sendo realizados com estas e outras espécies da família (Quadro 2). Estudos avaliando o potencial medicinal e aspectos fitoquímicos, sendo alguns associados a técnicas de cultura de tecidos vegetais, também já foram realizados com Rhamnaceas (RIBEIRO et al., 2015; SINGH et al., 2018; ÇALIŞKAN et al., 2019; ROCCHETTI et al., 2019; PARASHAR et al., 2019; GANDAGULE et al., 2019; LI et al., 2020; HUSSEIN; PRAKASH et al., 2021; SFERRAZZA et al., 2021; HAMAD, 2021).

Quadro 2 – Estudos *in vitro* de atividades biológicas com espécies da família Rhamnaceae.

<b>Espécie</b>	<b>Potencial medicinal</b>	<b>Substância com atividade</b>	<b>Referência</b>
<i>Ampelozizyphus amazonicus</i>	Antimalárico	Quinacrina	ISMAIL, 2019
<i>Ziziphus glaziovii</i>	Anti-helmíntico	Triterpenos	DOS SANTOS, 2019
<i>Zizyphus jujube</i>	Antidiabético e sedativo	Riboflavina e tiamina	SHAHRAJABIAN, 2019
<i>Ziziphus mauritiana</i>	Cardioprotetor e antioxidante	Ácido ascórbico	SHAHRAJABIAN, 2019; YOUL, 2019
<i>Frangula alnus</i>	Antioxidante e Antimicrobiana	Flavonoides	KREMER, 2012
<i>Rhamnus purpureus</i>	Antiinflamatório	–	THAKUR; PRASAD, 2019
<i>Rhamnus lycioides</i>	Antioxidante	–	BENAMAR et al., 2019
<i>Hovenia dulcis</i>	Antineoplásica	–	CASTRO et al., 2002
<i>Hovenia dulcis</i>	Antigiárdia	–	GADELHA et al., 2005

Estudos biotecnológicos visando à propagação *in vitro* de espécies dessa família já foram publicados, principalmente com as de uso medicinal, como *Frangula alnus*. Mill., *Frangula Rupestris*. (Escopo.) Schur., *Rhamnus catártico*. L. (KOVAČEVIĆ; GRUBIŠIĆ, 2005), *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke. (ANDRADE-NETO et al., 2008), *Ziziphus jujuba* (YILDIRIM et al., 2015) e *Z. spina-christi* (ASSAREH; SARDABI, 2005). Estudos de conservação *in vitro* foram realizados apenas para *Z. jujube* (WANG et al., 2015).

#### 1.4.1 *Hovenia dulcis* Thunb.

Segundo a base de dados do TRÓPICOS (2020), o gênero *Hovenia* Thunb. possui oito espécies catalogadas, sendo a maioria com mais de uma variedade. São elas: *H. acerba*, *H.*

*fulvotomentosa*, *H. inaequalis*, *H. kiukiangensis*, *H. parviflora*, *H. robusta*, *H. trichocarpa*, e a única das espécies do gênero encontrada no Brasil, *H. dulcis* (Figura 6).

O nome do gênero é uma homenagem a David Hoven, senador de Amsterdam que financiou diversas viagens para a realização dos estudos de Thunberg na Ásia (CARVALHO, 1994). O epíteto específico *dulcis* é uma referência à doçura das infrutescências. *Hovenia dulcis* é uma espécie arbórea oriunda da Ásia Oriental, com ampla ocorrência no Japão, China e Coréia (CARVALHO, 1994). A espécie é encontrada em regiões montanhosas, devido às condições climáticas ideais (regiões com alta altitude e climas frios) para sua adaptação (COSTA, 1934).

Figura 6 - Espécie *Hovenia dulcis*



Legenda – A: Habitus (Fonte: <https://www.sitiodamata.com.br/uva-japonesa-hovenia-dulcis>) B: Ramo com folhas e inflorescências imaturas (Foto: Cecília Azevedo) C: Botões de inflorescências (Foto: Cecília Azevedo) D: Inflorescências (Fonte: <https://sites.unicentro.br/wp/manejoflorestal/11612-2>) E: Pseudofrutos (Fonte: <https://www.colecionandofrutas.com.br/hoveniadulcis.htm>)

Existem dois registros de introdução da espécie no Brasil. Um deles em 1908, por ocasião da Exposição Nacional de Plantas Ornamentais e Exóticas, que ocorreu no Jardim Botânico do Rio de Janeiro (COSTA et al., 1934; STILLNER et al., 1983). O outro registro em 1987, quando o CNPFlorestas/EMBRAPA recebeu sementes de *H. dulcis* da Academia Chinesa de Florestas (CARVALHO, 1994). O histórico de inserção da espécie no país é pouco detalhado e por vezes confuso, uma vez que são apresentadas diversas versões. Entretanto, este histórico está sempre relacionado aos vários usos conhecidos para a espécie (CARVALHO, 1994), tais como suas aplicações medicinais e comerciais, as quais explicam as motivações da sua introdução.

O nome popular mais conhecido da espécie é uva-do-japão, porém outras denominações são adotadas, dependendo da região de ocorrência. No Sudeste os nomes mais utilizados são bananinha-do-japão, caju-do-japão, caju-japonês, cajueiro-japonês, chico-magro, gomari, matafome, passa-do-japão, passa-japonesa, pau-doce e uva-japonesa. Na região Sul os nomes mais utilizados são banana-do-japão, pé-de-galinha, tripa-de-galinha, uva-da-china e uva-do-japão (CARVALHO, 1994). Na Argentina, a árvore é conhecida como hovenia, palito dulce, uva, uva china, uva japonesa, uva paraguaya e uvilla (COZZO, 1960). Na China, é conhecida como Chih-chü e Kenan (KOLLER, 1979), no Japão, como Kenpo nashi (SHIRASAWA, 1983) e nos Estados Unidos como Raisin tree (KOLLER, 1979).

*Hovenia dulcis* é utilizada na medicina popular da Ásia, onde a casca do caule é empregada no tratamento de afecções intestinais (BASTOS, 1990) e os pseudofrutos são usados como diurético, antipirético e contra a diarreia (REN-BO et al., 2007). No Brasil, sua madeira é utilizada na construção civil, marcenaria, carpintaria, para confecção de forros, vigas, caibros, tábuas, assoalho, móveis, molduras, artesanato, objetos de adorno e laminados (CARVALHO, 1994). Seus pseudofrutos também têm uso popular no país, como medicamento antiasmático (BASTOS, 1990). Diversos estudos fitoquímicos e farmacológicos têm sido realizados com a espécie, com resultados promissores. Entre os estudos fitoquímicos, destacam-se aqueles nos quais foram identificadas substâncias das classes dos triterpenoides (KANG et al., 2017), flavonoides (CASTRO et al., 2002; RIBEIRO et al., 2015), alcaloides (TAKAI et al., 1973; CHO et al., 2013), polissacarídeos (WANG et al., 2012), ácidos orgânicos (LI et al., 2005; LE et al., 2018), saponinas (ALBARELLO et al., 2014), dihidroflavonóis e flavonóis (LI et al., 2005; MENG et al., 2016).

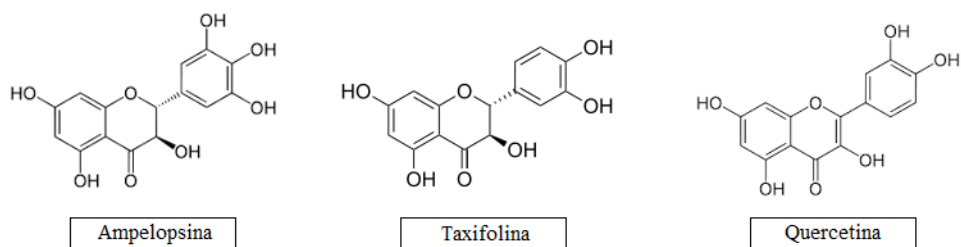
Substâncias fenólicas e saponinas triterpênicas já foram identificadas nos extratos de *H. Dulcis* (SFERRAZZA et al., 2021). As substâncias fenólicas relatadas são hovenodulinol, hovenitinas I, II e III, (+) - 3,3', 5', 5,7-penta-hidro-flavanona, laricitrina, miricetina, (+) - galocatecina, di-hidrokaempferol, di-hidrokaempferol, di-hidromitretina (ampelopsina) e quercetina. As saponinas triterpênicas relatadas são saponina C2,  $\beta$ -daucosterol, hovenidulciosídeos A1, A2, B1 e B2 (PARK et al., 2015; SFERRAZZA et al., 2021).

Entre os flavonoides identificados em *H. dulcis* está a ocorrência de diidromiricetina, também conhecida como ampelopsina, um dihidroflavonol (Figura 7). Segundo Kou e colaboradores (2012), essa substância foi isolada da espécie *Ampelopsis meliifolia* pela primeira vez em 1940. Sabe-se que existem diversos subtipos de ampelopsina, que apresentam diferentes atividades biológicas (PARK et al., 2015). Estudos recentes demonstraram que a ampelopsina possui potente atividade antineoplásica contra cânceres de fígado (QI et al., 2015), próstata (PARK et al., 2017), mama (TIENG et al., 2019) e bexiga (YUN et al., 2019). Adicionalmente, foram descritas as atividades antioxidante (PARK et al., 2017), anti-inflamatória (QI et al., 2012), antimicrobiana (KOU et al., 2012), mediadora de morte celular (YUN et al., 2019), hepatoprotetora e reguladora dos metabolismos lipídico e glicêmico (MURAKAMI et al., 2004), além de promover melhora no comprometimento cognitivo de ratos com doença de Alzheimer (WANG et al., 2020).

Outros flavonoides isolados de *H. dulcis* são a taxifolina e a quercetina (Figura 7). A taxifolina, também conhecida como dihidroquercetina, é utilizada no tratamento clínico de doenças coronárias e cardiovasculares (SUNIL; XU, 2019). Estudos recentes têm reportado que essa substância possui uma variedade de efeitos biológicos, incluindo antineoplásico, anti-inflamatório, antiviral, antibacteriano e antioxidante (CAI et al., 2019). A quercetina é mais frequentemente obtida a partir de raízes (PARVIN et al., 2019) e apresenta uma série de atividades farmacológicas como antioxidante (IRMISCH et al., 2019), analgésica (MONDAL et al., 2019) e anti-inflamatória (KIM et al., 2019).



Figura 7 - Estrutura química de alguns flavonoides encontrados em *Hovenia dulcis*.



Legenda: Park et al., 2016

Extratos preparados a partir de diferentes órgãos de *H. dulcis* apresentaram atividades hepatoprotetora (PARK et al., 2019), antioxidante (WANG et al., 2012) e anti-gástrica (GADELHA et al., 2005). Atividades antioxidante (RIBEIRO et al., 2015) antineoplásica (RIBEIRO, 2013; CASTRO et al., 2002) e tripanocida (CASTRO et al., 2002), também foram observadas em extratos obtidos de materiais *in vivo* e cultivados *in vitro* (Quadro 3).

Quadro 3 – Atividades biológicas a partir de estudos *in vitro* de diferentes extratos de *H. dulcis*.

<b>Material vegetal</b>	<b>Atividade</b>	<b>Tipo de extrato</b>	<b>Substâncias/Fração responsáveis pela atividade</b>	<b>Referência</b>
Pseudofruto	Desintoxicação de álcool	Aquoso	Hovenodulinol; Ampelopsina	XIANG et al., 2012
	Hepatoprotetor	Aquoso	Ampelopsina	WANG et al., 2012
	Antioxidante	80% metanol	Complexos polifenólico-proteína-polissacarídeos; Compostos fenólicos	GÖÇMEN et al., 2000
	Antidiabetes	Aquoso; Etanólico	Flavonóides totais, mirricetina e polissacarídeos	SANG, 2005; MENG et al., 2016
	Antiestresse	Aquoso	-	NA et al., 2013
	Antialérgico	Metanólico	Hovenidulciosídeos A1, A2, B1 B2	XU et al., 2004; YOSHIKAWA et al., 1995
	Anti-inflamatório	Extrato etanólico	Ampelopsina; Taxifolina; Miricetina	JEONG et al., 2009
Casca	Antineoplásico	Fração de éter dietílico do extrato etanólico	-	ZHANG et al., 2007
	Neuroprotetor	Fração etanólica do extrato metanólico	(-) - catequina e (+) -afzelequina	LI et al., 2005
	Antioxidante	Fração etanólica do extrato metanólico	-	LI et al., 2005
Folha	Antipatogênico	Fração diclorometano do extrato metanólico	-	GADELHA et al., 2005
	Antimicrobiana	Fração metanólica do extrato em água quente	Ácidos vanílicos e ferúlicos	CHO et al., 2000; PINENT et al., 2008
	Antimutagênico	Fração clorofórmica do extrato metanólico	-	SUN-HEE et al., 2007
	Antineoplásico	Fração clorofórmica do extrato metanólico; Fração de acetato de etila	-	SUN-HEE et al., 2007; ARAÚJO et al., 2021
	Antioxidante	Extrato etanólico	-	RIBEIRO et al., 2015
	Antineoplásico	Extrato etanólico	-	RIBEIRO et al., 2015
Galhos	Laxante	Extrato aquoso	Ácido vanílico	OH et al., 2020
	Anti-inflamatório	*	Vanilato de metila	LIM et al., 2016
Calo	Antioxidante	Extrato etanólico	-	RIBEIRO et al., 2015

\*O artigo não descreve o preparo do extrato.

Extratos de quase todas as partes vegetais de *H. dulcis*, como raiz, casca, folhas, sementes e pseudofrutos apresentam atividades biológicas (SFERRAZZA et al., 2021). Por conta disso, a espécie tem sido objeto de estudos por diferentes grupos de pesquisa, incluindo estudos biotecnológicos, já tendo sido estabelecidos protocolos de micropropagação por organogênese direta (ECHEVERRIGARAY et al., 1998; PARK et al., 2006) e por organogênese indireta (JEONG et al., 2009), além de culturas de calos (EOM et al., 2002; RIBEIRO et al., 2015; RIBEIRO et al., 2021).

No Laboratório de Biotecnologia de Plantas (Labplan), que faz parte do Núcleo de Biotecnologia Vegetal (NBV), do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG), da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), já foram estabelecidos protocolos de germinação de sementes *in vitro* e de micropropagação (CASTRO, 2001), culturas de calos friáveis, suspensões celulares (RIBEIRO et al., 2021), calos compactos e culturas do tipo CCC (*Compact Callus Cluster*) (RIBEIRO et al., 2015). A partir desses estudos foi estabelecido um sistema de produção de saponinas *in vitro*, que resultou em um pedido de patente (RIBEIRO, 2013; ALBARELLO et al., 2014).

Considerando a relevância do estabelecimento de culturas *in vitro*, conservação e manutenção de capacidade biossintética de plantas medicinais, muitos estudos têm sido realizados empregando-se metodologias de cultura de tecidos vegetais, criopreservação e avaliação fitoquímica, de forma complementar ou isolada, a fim de elucidar e propor possibilidades para remediar as crescentes taxas de perdas de germoplasma vegetal que ocorrem mundialmente (TOWILL, 2002; VANISREE et al., 2004; VENTER et al., 2018).

Dessa forma, esse trabalho teve por objetivo estabelecer um protocolo de criopreservação para *Hovenia dulcis*, bem como avaliar a manutenção da capacidade biossintética do material criopreservado em comparação às suas matrizes. Vale também destacar que o presente estudo é o primeiro na área de criopreservação com uma espécie do gênero *Hovenia*, podendo servir de referência no estabelecimento de protocolos de conservação *in vitro* para outras espécies da família Rhamnaceae.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Estabelecer um protocolo de criopreservação pela técnica de V-Crioplaca para ápices caulinares de plantas propagadas *in vitro* de *Hovenia dulcis* e avaliar o perfil fitoquímico das plantas oriundas do processo de criopreservação, em relação às plantas mantidas *in vitro* e a campo.

### 2.2 Específicos

- Avaliar o uso de ápices caulinares oriundos de microestacas e obtidos diretamente das plantas matrizes, na criopreservação;
- Investigar o efeito do tempo de exposição dos ápices à solução de vitrificação PVS2;
- Avaliar o efeito de diferentes concentrações às citocininas 6-benzilaminopurina (BA) e cinetina (KIN) no meio de regeneração após a criopreservação;
- Avaliar o uso do papel de filtro sobre o meio de recuperação como base para a inoculação dos ápices caulinares após a criopreservação;
- Realizar um estudo comparativo dos perfis obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) de extratos de plantas mantidas *in vitro*, plantas oriundas do processo de criopreservação e plantas desenvolvidas em condições naturais.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos relativos a criopreservação e criopreservação foram realizados no Laboratório de Biotecnologia de Plantas (Labplan), que faz parte do Núcleo de Biotecnologia Vegetal (NBV), do Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes (IBRAG), da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ). As análises fitoquímicas foram realizadas no Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais (LPPN) do NBV/IBRAG/UERJ e na Central Analítica Fernanda Coutinho do Instituto de Química (IQ) da UERJ.

#### 3.1 Material vegetal

As sementes que deram origem às primeiras culturas *in vitro* foram coletadas no município de Teresópolis, RJ (22°26'23"S 42°58'36"W) e uma excizada da espécie foi depositada no Herbário da UERJ, sob o registro HRJ1426. A partir de sementes germinadas *in vitro* foram estabelecidas as culturas de *H. dulcis* (CASTRO, 2001).

Plantas propagadas *in vitro*, oriundas de explantes caulinares foram usadas como matrizes para os ensaios de criopreservação. As culturas foram mantidas em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) contendo 0,09 M de sacarose (30 g/L), suplementado com 0,5 mg L<sup>-1</sup> de BA + 0,5 mg L<sup>-1</sup> KIN e solidificado com 8 g L<sup>-1</sup> de ágar (CASTRO, 2001). O pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da adição de ágar e a esterilização foi realizada em autoclave (121° C, 104 kPa) por 15 min. A manutenção das culturas estoque foi realizada por meio de subcultivos de segmentos caulinares apicais com, aproximadamente, 2 cm de comprimento para meio fresco de igual composição, a cada 60 dias. As culturas foram mantidas em câmara de crescimento à temperatura de 26 ± 2°C, sob fotoperíodo de 16 h, com intensidade luminosa de 45 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>.

## 3.2 Criopreservação

### 3.2.1 Preparo do material botânico e pré-cultivo dos explantes

Segmentos caulinares de aproximadamente 1 cm, contendo de um a dois nós, foram excisados de culturas estoque com 60 dias de cultivo e inoculados verticalmente em potes de vidro (60 x 90 mm; 10 segmentos caulinares por frasco) contendo 30 mL de meio de cultura MS, contendo 0,09 M de sacarose (30 g/L), solidificado com 8 g L<sup>-1</sup> de ágar, sem suplementação hormonal (MS0) e pH 5.8. Após 21 dias de cultivo, os ápices caulinares com 1,5 mm a 2,0 mm de comprimento foram obtidos dessas microestacas e utilizados como fonte de explante nos ensaios de criopreservação (Figura 8).

Além das microestacas, brotos axilares desenvolvidos diretamente das culturas estoque com 60 dias de cultivo também foram usados como fonte de ápices caulinares (1,5 - 2,0 mm) para os ensaios de criopreservação. Ápices caulinares foram submetidos ao protocolo de criopreservação definido como o mais eficiente para aqueles excisados das microestacas.

Os ápices caulinares obtidos de microestacas ou culturas estoque foram pré-cultivados por 24 h em placas de Petri (90 × 15 mm) contendo meio MS suplementado com 0,3 M de sacarose e 8 g L<sup>-1</sup> agar. O pH do meio de pré-tratamento foi ajustado para 5.8, antes de ser autoclavado por 15 min. Esses ápices foram mantidas no escuro e a uma temperatura de 26 ± 2° C.

### 3.2.2 Criopreservação com a técnica V-Crioplaca

Foram utilizadas crioplacas de alumínio (7 mm largura x 37 mm comprimento x 0.5 mm espessura) com 10 poços (1,5 mm largura x 2,5 mm comprimento x 0,75 mm profundidade, Criopleca número 3), cedidas pelos pesquisadores Dr. Florent Engelmann (IRD/Montpellier - França) e Dr. Takao Niino (NIAS/ Tsukuba - Japão). Para a aderência dos ápices caulinares, com o auxílio de uma pipeta, foi adicionada uma gota (2 µL) de solução de 3% de alginato de sódio (baixa viscosidade, Sigma-Aldrich® A2158) , em cada poço da crioplaca. Essa solução foi

preparada com o meio MS sem cálcio, suplementado 0,09 M de sacarose e pH 5.8 . Em seguida, os ápices caulinares pré-cultivados foram dispostos sobre a solução de alginato de sódio e receberam mais uma gota dessa solução. Após essa etapa, uma solução de cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) foi gotejada ao longo da superfície das crioplaças, permanecendo por 15 min à temperatura ambiente até a completa polimerização. A solução de  $\text{CaCl}_2$  (100 mM) também foi preparada em meio MS contendo 0,09 M de sacarose e pH 5.8. O excesso da solução de  $\text{CaCl}_2$  foi removido com auxílio de uma pipeta e as crioplaças foram secas em papel de filtro (Whatman n°1). As crioplaças com os ápices aderidos foram introduzidas em criotubos (2,0 mL) contendo 2 mL da solução de osmoproteção (*loading*), permanecendo por 20 min à temperatura ambiente. A solução de osmoproteção é composta de meio MS, 2,0 M de glicerol e 0,4 M de sacarose com ph de 5.8, e filtrada para a esterelização (NISHIZAWA et al., 1993). Em seguida, o material foi exposto à 2 mL de solução de vitrificação PVS2 (30% de glicerol, 15% de etilenoglicol, 15% de DMSO e 0,4 M de sacarose, em sais de meio MS, filtradas para a esterelização SAKAI et al., 1990) em criotubos por 0, 15, 30, 60, 90, 120 ou 150 min à temperatura de 0°C. Finalmente, as crioplaças foram transferidas para criotubos (2 mL) completamente preenchidos por NL, onde permaneceram por 15 min.

Como controle do NL (NL-), uma parte das crioplaças com os os ápices caulinares aderidos passou pelas etapas de pré-cultivo, exposição a solução de osmoproteção e exposição a solução de vitrificação (PVS2), com exceção do congelamento em NL .

### 3.2.3 Reaquecimento e recuperação de cultura após a criopreservação

Para o reaquecimento, as crioplaças contendo os ápices caulinares foram removidas rapidamente do NL e imersas diretamente em solução descarregamento (*unloading*) (meio MS + 1,2 M de sacarose) por 20 min à temperatura ambiente. A solução de descarregamento é composta de meio MS e 1.2 M de sacarose com ph de 5.8 e filtrada para a esterelização.

Após o reaquecimento, os ápices foram removidos das crioplaças com auxílio de uma pinça, secos em papel de filtro (Whatman n°1) e transferidos para frascos de cultura (45 mm x 45 mm) contendo 15 mL de meio MS suplementado com 0,009 M sacarose, associação das citocininas BA e KIN (0,2 ou 0,5 mg L<sup>-1</sup>), 8 g L<sup>-1</sup> de agar com o pH 5.8, aferido antes da autoclavagem. Dez ápices foram inoculados por frasco e foram mantidos no escuro durante uma

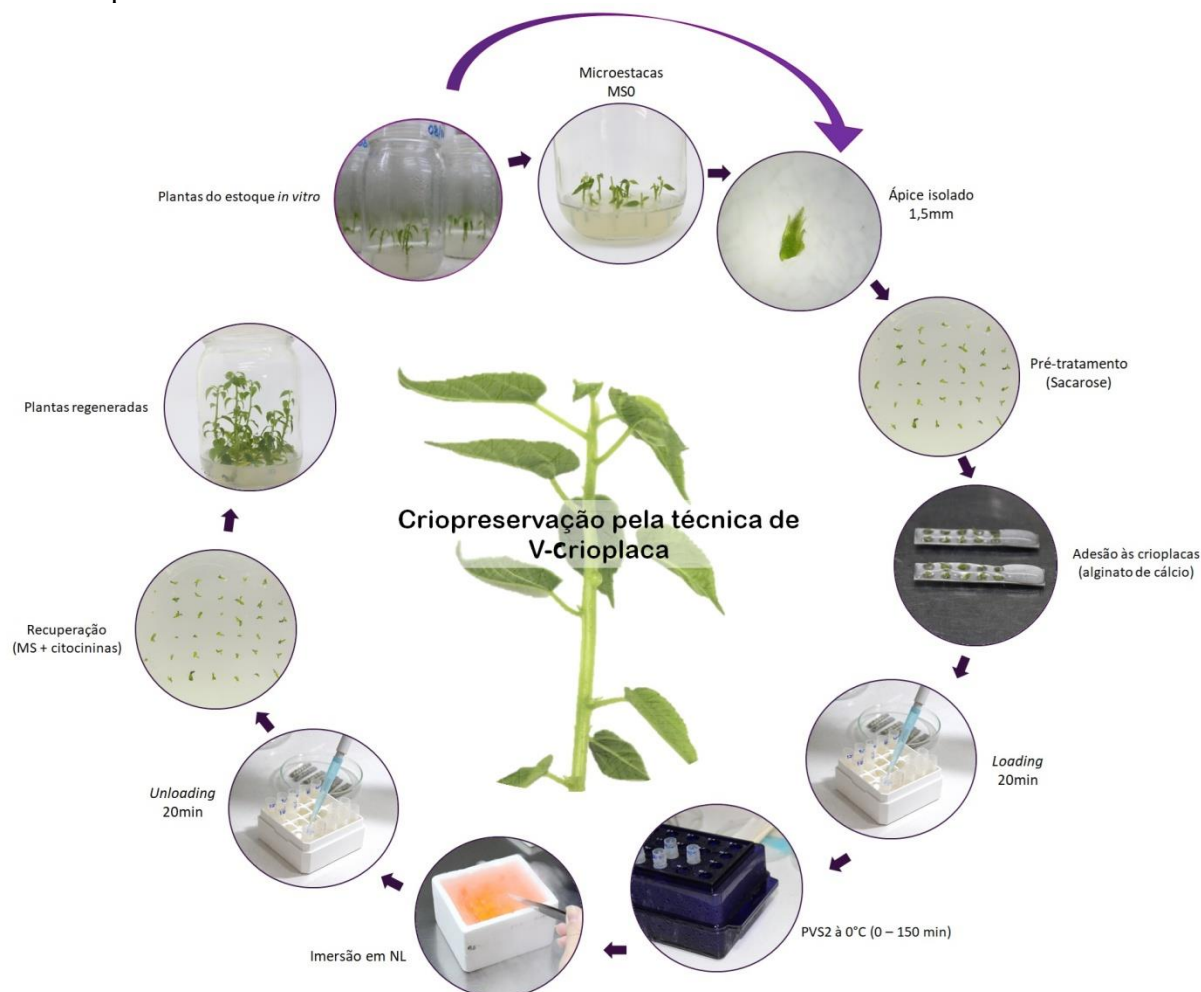
semana a uma temperatura de  $26 \pm 2^\circ \text{C}$ . Após este período, as culturas foram transferidas para luz difusa ( $20 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) até completarem quatro semanas e, em seguida, para a luminosidade padrão usada no cultivo das plantas matrizes ( $45 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ). Nessa etapa, foi avaliado o efeito do uso de papel de filtro (Whatman nº1) sobre o meio de cultura de recuperação, como base para a inoculação dos ápices. Quando utilizado, o papel de filtro foi mantido por sete dias e, em seguida, os ápices foram transferidos diretamente para o meio de cultura.

A eficiência do processo de criopreservação dos ápices caulinares de *H. dulcis* foi determinada pela porcentagem de ápices que se mantiveram verdes (sobrevivência) e apresentaram expansão de primórdio foliar e/ou proliferação celular (recuperação). A sobrevivência e a recuperação foram determinadas com trinta e sessenta dias após o reaquecimento, respectivamente. Adicionalmente, após 120 dias de cultivo, foram contados o número médio de brotos das plantas formadas por ápice recuperado do processo de criopreservação.

As etapas de criopreservação empregada para os ápices caulinares de *H. dulcis* nesse documento estão representadas na figura 8.



Figura 8 – Etapas do processo de criopreservação de ápices caulinares de *H. dulcis* pela técnica de V-Crioplaca.



### 3.3 Análise estatística

Os experimentos foram realizados em triplicata, com um número amostral de 10 ápices para cada repetição. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância ( $p \leq 0,05$ ), utilizando o programa GraphPad Prism 5.00. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão

### 3.4 Avaliação da capacidade biossintética

#### 3.4.1 Material vegetal

Para as análises fitoquímicas, foram utilizadas folhas de plantas coletadas a campo (FC), plantas matrizes propagadas *in vitro* (PV), mantidas em cultivo por 60 dias, e plantas regeneradas a partir de ápices caulinares criopreservados (PC), após 120 dias da regeneração.

#### 3.4.2 Preparo dos extratos

Os extratos foram preparados empregando-se a metodologia descrita no trabalho de Park e colaboradores (2015). O material vegetal foi seco em liofilizador (LIOTOP L101) e triturado com o auxílio de um moinho (IKA). A seguir, o pó (2g) foi submetido a refluxo por 3 horas em água (80 ml), e a solução centrifugada (DAMON HN-S) por 10 min a 4.000 rpm para remover as partículas insolúveis. O sobrenadante foi congelado, submetido à liofilização durante uma semana e armazenado em frascos âmbar até sua utilização.

#### 3.4.3 Preparo dos padrões

Foram utilizados padrões de flavonoides previamente identificados em *H. dulcis*, a saber: Dihidromirecetina (Ampelopsina) (Sigma); Quercetina (Sigma); Taxifolina (Sigma) e Rutina (Sigma). Essas substâncias foram solubilizadas em metanol e utilizadas para as análises cromatográficas na concentração de 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

#### 3.4.4 Análise por cromatografia em fase líquida de alta eficiência (CLAE)

As amostras dos extratos liofilizados (250 mg) foram diluídas em 1 mL de metanol grau espectroscópico (Tedia, Brasil), submetidas à solubilização com auxílio de ultrassom por 5 min e, em seguida, filtradas em filtro Millipore de 0,45  $\mu\text{m}$  (Merck, Alemanha).

A caracterização química das amostras foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), no equipamento Agilent 1260, constituído de bomba de dois canais G1312B, degaseificador G4225A, amostrador automático G1329B, compartimento de coluna termoestabilizado G1316A, detector UV-DAD G4212B. A separação foi realizada utilizando-se uma coluna Hypersil Gold C18 de 250 mm x 4.6 mm i.d. (com partícula de 5A). A fase móvel foi constituída por água ultrapura acidificada com ácido acético glacial (pH 3,0) (A) e acetonitrila (TEDIA<sup>®</sup>) (B). O método empregado foi em gradiente e encontra-se descrito no quadro 4.

Quadro 4 – Gradiente composto pelas soluções A (água ultrapura MilliQ<sup>®</sup> acidificada com ácido acético glacial a 1% com pH 3,0) e solução B (acetonitrila) empregado nas análises por CLAE-UV para a determinação do perfil cromatográfico de material *in vitro* e de campo de *Hovenia dulcis*.

<b>Tempo (min)</b>	<b>Solução A (%)</b>	<b>Solução B (%)</b>
0 – 2	95	5
2 – 55	35	65
55 – 60	0	100
70	95	5

Foi dado um intervalo de 5 min entre as injeções eluindo a fase móvel inicial para garantir que a coluna esteja re-acondicionada, com o fluxo de 1 mL min<sup>-1</sup> em toda a análise. O volume de injeção foi de 20 µL e a temperatura do compartimento da coluna mantida em 40°C.

Para as análises, foram armazenados todos os espectros de UV (entre 190 - 640 nm) e selecionados os comprimentos de 191, 254, 280, 320, 340, 420, 480 e 600 nm para o monitoramento. Os cromatogramas em 254 nm e 340 nm foram utilizados para obtenção dos resultados. Os sinais dos cromatogramas foram manipulados com auxílio do programa Class-VP.

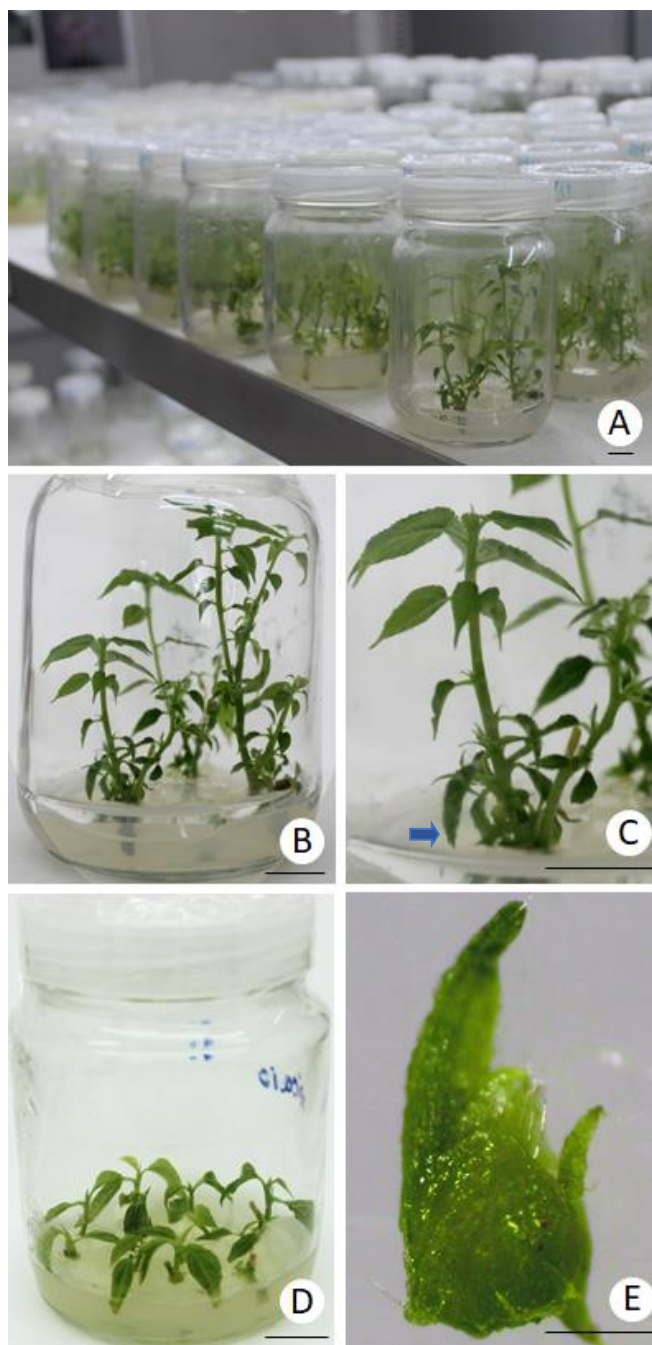
## 4 RESULTADOS

### 4.1 Material vegetal

Antes de dar início aos estudos de criopreservação, foi determinado o tempo em cultura para as plantas *in vitro* utilizadas como fonte de explantes (Figura 9A), assim como o tempo em cultura das microestacas até à excisão dos ápices (RIBEIRO, 2013).

Como as plantas propagadas *in vitro* apresentavam um desenvolvimento lento, foi estabelecido o tempo de cultivo de dois meses para que fossem utilizadas como fontes de explantes. As plantas apresentavam um comprimento variando de 5 a 8 cm, contendo de 6 a 8 nós (Figuras 9B e 9C). As microestacas, alcançaram um comprimento médio de 3 cm após um período de cultivo de três semanas (Figura 9D), apresentando ápices caulinares bem desenvolvidos (Figura 9E).

Figura 9 – Plantas de *H. dulcis* propagadas *in vitro*.



Legenda– Plantas mantidas em meio MS suplementado com  $0,5\text{mg.L}^{-1}$  BA +  $0,5\text{mg.L}^{-1}$  KIN. Aspecto das plantas após 60 dias de desenvolvimento (A); Detalhe da característica de multibrotação (seta) (C); Microestacas após três semanas de cultivo (D); Ápice caulinar isolado a partir de uma microestaca (E). Barras (A-D) = 1 cm; Barra (E) = 1mm.

## 4.2 Criopreservação pela técnica de V-Crioplaca

### 4.2.1 Avaliação da etapa de pré-cultivo

A fim de avaliar a capacidade de recuperação dos ápices caulinares após a exposição à alta concentração de sacarose (0,3 M) por 24h, os ápices foram inoculados em meio de cultura MS com a mesma composição utilizada na manutenção das plantas matrizes (0,5 mg L<sup>-1</sup> BA + 0,5 mg L<sup>-1</sup> KIN). Foi observada a regeneração de plantas completas a partir dos ápices, demonstrando que esta etapa do protocolo não causou injúrias ao material (dados não mostrados).

### 4.2.2 Criopreservação de ápices oriundos de microestacas

Inicialmente, os estudos de criopreservação de *H. dulcis* foram realizados utilizando-se ápices caulinares excisados de microestacas, sem o uso de papel de filtro como suporte no início da etapa de recuperação.

Ápices não imersos em NL (NL-) e submetidos à etapa de recuperação em meio contendo a mesma concentração de citocininas utilizada na manutenção das plantas matrizes (0,5 mg.L<sup>-1</sup> BA + 0,5 mg.L<sup>-1</sup> KIN) apresentaram altas porcentagens de sobrevivência (86% – 100%), independentemente do tempo de exposição à PVS2. Com relação a recuperação, os valores variaram de 53% a 93%, sendo mais elevados quando a exposição ao PVS2 foi de 120 min (Tabela 1).

Por outro lado, a exposição à PVS2 por períodos superiores a 15 min foi essencial para a recuperação dos ápices criopreservados (NL+) (Tabela 1). Ápices não expostos à PVS2 ou expostos por apenas 15 min ficavam esbranquiçados a partir da primeira semana em meio de recuperação. Houve um aumento tempo-dependente da eficiência do processo de recuperação, quando considerados os tratamentos de 30 a 120 min. Por outro lado, embora não significativa, houve uma tendência de redução nos valores desses parâmetros quando o tratamento foi realizado durante 150 min. Os valores máximos de sobrevivência (87%) e recuperação (45%) foram alcançados quando os explantes foram expostos à PVS2 por 120 min antes da imersão em NL (Tabela 1). Esses ápices começavam a se desenvolver por volta da segunda semana após a

criopreservação, apresentando coloração verde e sinais de crescimento dos primórdios foliares. Vale ressaltar, que alguns ápices criopreservados apresentaram a formação de calos após a transferência para o meio de recuperação e dessa forma, foram contabilizados apenas para o parâmetro sobrevivência.

Os brotos desenvolvidos a partir dos ápices criopreservados apresentaram em média tamanho de 1 a 1,5 cm, após 2 meses, quando foram contabilizadas as porcentagens de recuperação. Alguns desses brotos começaram a apresentar um aspecto hiperídrico entre o primeiro e o segundo mês, após a criopreservação. Entretanto, essa característica não era mais observada após o primeiro subcultivo, realizado com 30 dias em meio de recuperação. Após quatro meses do processo de criopreservação, foram obtidas plantas saudáveis, com aspecto semelhante às plantas matrizes. Os ápices do grupo controle (NL-) apresentaram um desenvolvimento mais rápido e um aspecto mais vigoroso, quando comparados aos criopreservados (NL+) (Figura 10). A característica de multibrotação presente em algumas plantas de *H. dulcis* mantidas *in vitro* (Figura 9C) também foi observada nas plantas oriundas do processo de criopreservação, com uma média de três brotos por planta. Tanto para ápices expostos a NL quanto para ápices controles.

Os explantes que não sobreviveram ao processo de criopreservação apresentaram sinais de degeneração durante a segunda semana de cultivo, principalmente após transferência para a luz difusa. Para se verificar se o aumento de tempo de manutenção do material no escuro poderia influenciar o processo de recuperação, foi realizado um ensaio aumentando o período de incubação no escuro para duas semanas. Entretanto, não foi observada melhora do aspecto do material (dados não mostrados) e, desta forma, optou-se por se manter, nos experimentos seguintes, as mesmas condições de luminosidade já utilizadas.

Tabela 1 – Efeito da exposição à PVS2 na sobrevivência e recuperação de ápices caulinares oriundos de microestacas de *H. dulcis*, não criopreservados (NL-) e criopreservados (NL+) pela técnica de V-Crioplaca, após recuperação em meio MS suplementado com 0,5 mg L<sup>-1</sup> de BA + 0,5 mg L<sup>-1</sup> de KIN.

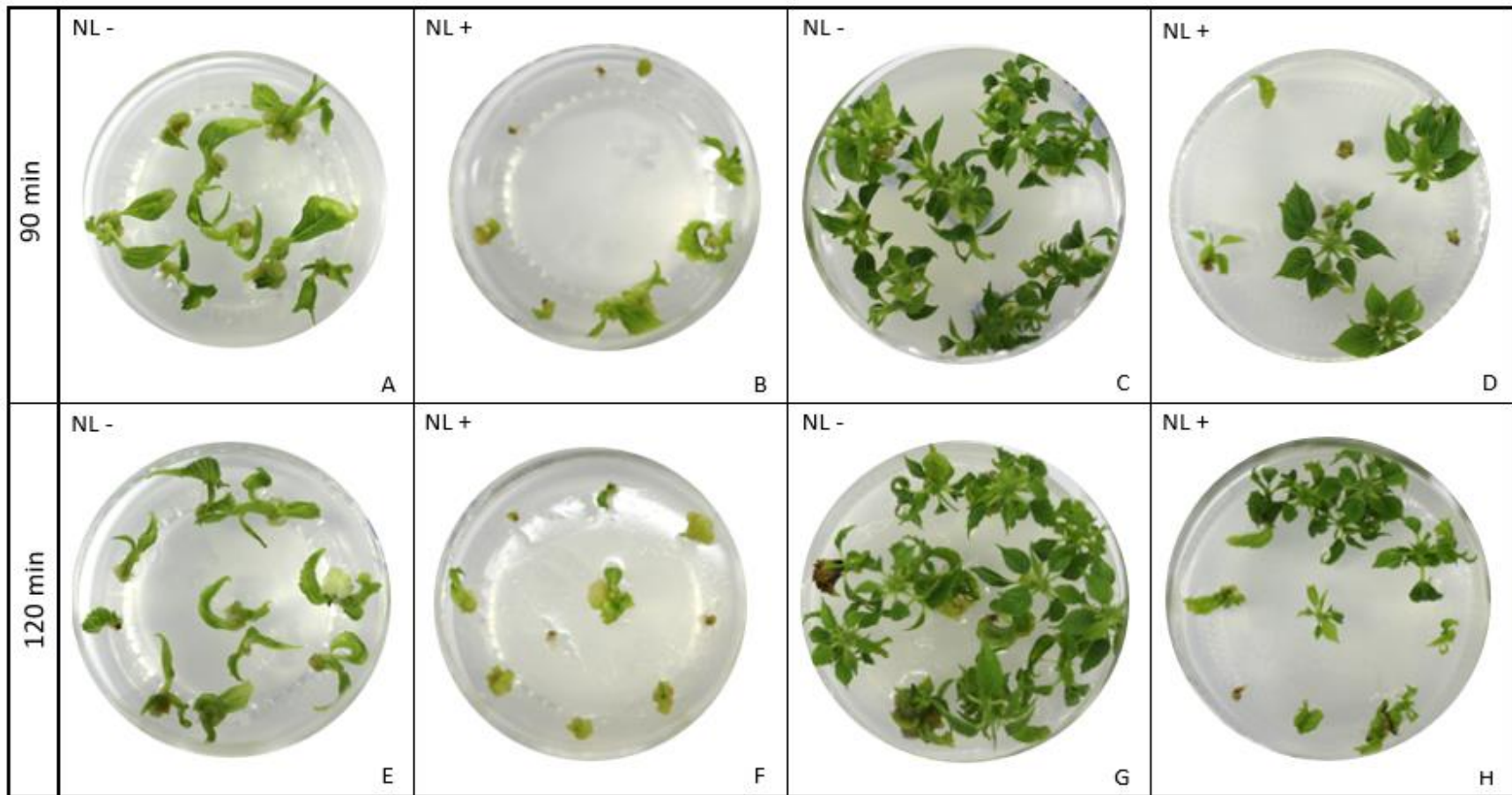
Exposição ao PVS2 (min)	Sobrevivência (%)		Recuperação (%)	
	NL-	NL+	NL-	NL+
0	100,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>c</sup>	65,00 ± 5,00 <sup>b</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>b</sup>
15	100,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>c</sup>	80,00 ± 20,00 <sup>ab</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>b</sup>
30	100,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	35,45 ± 8,67 <sup>b</sup>	68,52 ± 7,10 <sup>b</sup>	21,59 ± 2,78 <sup>ab</sup>
60	86,67 ± 6,67 <sup>a</sup>	73,33 ± 14,53 <sup>a</sup>	73,89 ± 3,89 <sup>b</sup>	30,00 ± 10,00 <sup>ab</sup>
90	91,11 ± 4,84 <sup>a</sup>	79,44 ± 10,82 <sup>a</sup>	66,67 ± 8,87 <sup>b</sup>	43,61 ± 4,72 <sup>a</sup>
120	100,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	87,73 ± 6,33 <sup>a</sup>	93,33 ± 6,67 <sup>a</sup>	45,45 ± 12,41 <sup>a</sup>
150	100,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	70,00 ± 10,00 <sup>a</sup>	53,33 ± 3,33 <sup>b</sup>	33,33 ± 12,02 <sup>ab</sup>

Nota: Os dados representam média ± erro padrão.

Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa entre os tratamentos ( $p \leq 0,05$ ) pelo teste de Tukey.



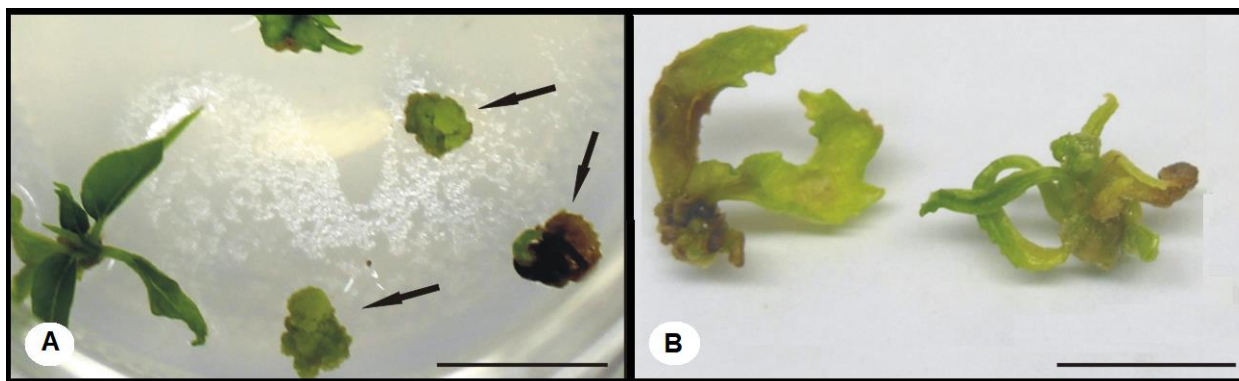
Figura 10 – Desenvolvimento de ápices caulinares de *Hovenia dulcis* criopreservados pela técnica de V-Crioplaca, após exposição à solução de PVS2 e posterior recultivo em meio MS suplementado com  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP +  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de KIN.



Legenda: Após 30 dias de cultivo (A; B; E; F); após 60 dias de cultivo (C; D; G; H). Barra = 1 cm  
 NL-: Controle; NL+: criopreservados

Em função da ocorrência de hiperhidricidade e de calogênese, quando os ápices criopreservados (NL+) e controles (NL-) foram inoculados no meio MS suplementado com  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  BA +  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  KIN (Figura 11), um novo ensaio foi realizado visando avaliar o efeito da redução da concentração das citocininas no meio de recuperação ( $0,2 \text{ mg L}^{-1}$  BA +  $0,2 \text{ mg L}^{-1}$  KIN). Para esse estudo, foram utilizados apenas os tempos de exposição à solução PVS2 superiores a 30 min, levando em consideração os resultados observados anteriormente.

Figura 11 – Desenvolvimento de calogênese e hiperhidricidade em ápices caulinares de *H. dulcis* submetidos ao processo de criopreservação pela técnica de V-Crioplaca, após 90 dias de cultivo em meio MS suplementado com  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  das citocininas BA e KIN.



Legenda: Ápices apresentando calogênese (setas) (A) e com desenvolvimento de folhas com aspecto hiperhídrico (B). Barras = 1 cm.

Quanto aos parâmetros de sobrevivência e recuperação, a redução da concentração de citocininas no meio de recuperação não mostrou resultados superiores aos alcançados anteriormente (Tabela 2).

Para os ápices não imersos em NL, embora tenha sido observada uma redução na sobrevivência, os valores ainda permaneceram altos (83% - 96%). Assim como observado anteriormente no protocolo empregando-se as maiores concentrações de citocininas, a maior capacidade de recuperação desses ápices foi alcançada quando a solução PVS2 foi utilizada por 120 min (72%).

Para os ápices imersos em NL, o aumento do tempo de exposição à solução de vitrificação resultou em uma maior eficiência do processo de criopreservação, sendo alcançados

valores máximos tanto de sobrevivência (63%) como de recuperação (40%) no tempo de exposição de 150 min (Tabela 2 e Figura 12).

A redução da concentração das citocininas no meio de recuperação não teve efeito inibidor na ocorrência de calogênese ou hiperhidricidade. Ao contrário do esperado, foi observado um aumento dessas respostas nas plantas regeneradas a partir dos ápices criopreservados e em algumas desenvolvidas a partir de ápices do grupo controle. Entretanto, a característica de hiperhidricidade observada inicialmente no material recuperado da criopreservação também não se manteve ao longo das subculturas e as plantas passaram a apresentar um aspecto fenotípico normal. O tempo de desenvolvimento dos materiais submetidos a esse protocolo, assim como a ocorrência de multipbrotação, foram semelhantes ao observado anteriormente.

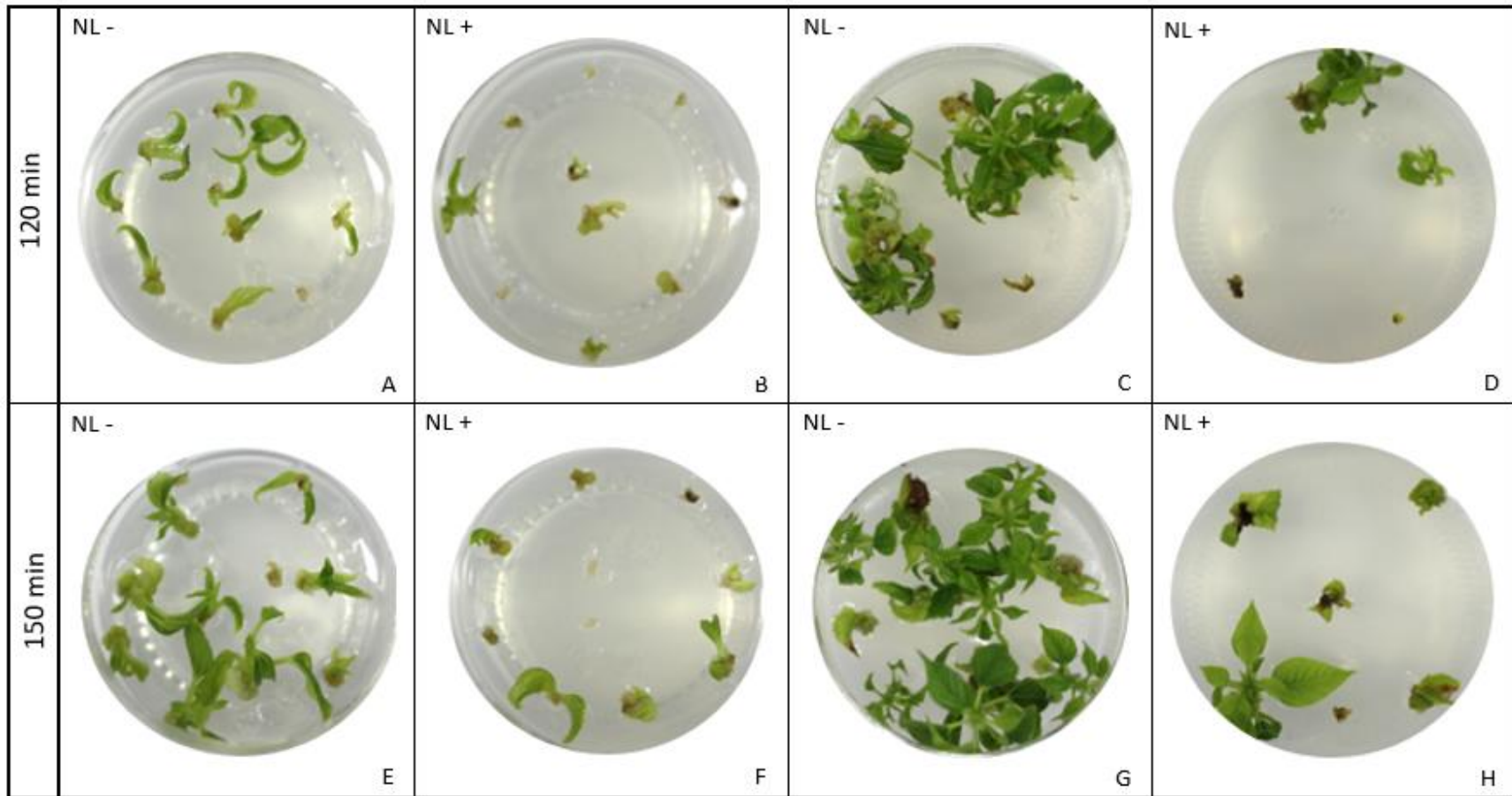
Tabela 2 – Efeito da exposição à PVS2 na sobrevivência e recuperação de ápices caulinares oriundos de microestacas de *H. dulcis*, não criopreservados (NL-) e criopreservados (NL+) pela técnica de V-Crioplaca, após recuperação em meio MS suplementado com 0,2 mg L<sup>-1</sup> de BA + 0,2 mg L<sup>-1</sup> de KIN.

Exposição ao PVS2 (min)	Sobrevivência (%)		Recuperação (%)	
	NL-	NL+	NL-	NL+
60	95,00 ± 2,89 <sup>a</sup>	40,00 ± 5,77 <sup>ab</sup>	56,67 ± 14,53 <sup>a</sup>	22,50 ± 4,79 <sup>a</sup>
90	83,33 ± 6,67 <sup>a</sup>	51,11 ± 10,60 <sup>ab</sup>	70,00 ± 00,00 <sup>a</sup>	23,33 ± 3,33 <sup>a</sup>
120	83,89 ± 9,73 <sup>a</sup>	32,50 ± 7,50 <sup>b</sup>	72,50 ± 4,79 <sup>a</sup>	26,67 ± 6,67 <sup>a</sup>
150	96,67 ± 3,33 <sup>a</sup>	63,33 ± 3,33 <sup>a</sup>	66,67 ± 8,82 <sup>a</sup>	40,00 ± 5,77 <sup>a</sup>

Os dados representam média ± erro padrão.

Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa entre os tratamentos ( $p \leq 0,05$ ) pelo teste de Tukey.

Figura 12 – Desenvolvimento de ápices caulinares de *H. dulcis* criopreservados pela técnica de V-Crioplaca após exposição à solução de PVS2 e posterior recultivo em meios MS suplementado com 0,2 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 0,2 mg L<sup>-1</sup> de KIN.



Legenda: Após 30 dias de cultivo (A; B; E; F); após 60 dias de cultivo (C; D; G; H). Barra = 1 cm

NL-: Controle; NL+: criopreservados

Visando o aprimoramento do protocolo, foi também avaliada a possibilidade de promover uma reidratação mais gradativa, utilizando-se uma folha de papel de filtro sobre o meio de cultura para a inoculação dos ápices na etapa de recuperação. Inicialmente, o papel de filtro foi empregado em meio suplementado com as citocininas na maior concentração testada ( $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  BA +  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  KIN). Para ápices não criopreservados foram observadas altas taxas de sobrevivência (96% - 100%) para todos os tempos de exposição à PVS2. Quanto à recuperação, os maiores tendências (80% - 92%) foram alcançados por ápices expostos ao PVS2 por até 90 min (Tabela 3).

Em ápices criopreservados, a exposição à PVS2 por 120 min resultou numericamente em maiores taxas de sobrevivência (68%) e recuperação (62%). Embora as taxas de sobrevivência tenham sido menores quando comparadas ao protocolo sem uso de papel de filtro (Tabela 1), foi observada a recuperação da maior parte dos ápices que demonstraram sinais de sobrevivência no primeiro mês de cultivo (Figura 13). Adicionalmente, essa modificação resultou na redução da calogênese para 3% e no desenvolvimento mais rápido dos ápices, sendo observada a formação de primórdios foliares já na primeira semana de cultivo no meio de recuperação.

Após quatro subcultivos mensais, foram obtidas plantas vigorosas, idênticas às matrizes e com uma maior capacidade de multibrotação, quando comparados aos ápices não criopreservados, sendo o número médio de brotos inversamente proporcional ao tempo de exposição à solução de vitrificação (Tabela 3).

Tabela 3 – Efeito da exposição à PVS2 na sobrevivência e recuperação de ápices caulinares oriundos de microestacas de *H. dulcis*, não criopreservados (NL-) e criopreservados (NL+) pela técnica de V-Crioplaca, após recuperação em meio MS suplementado com 0,5 mg L<sup>-1</sup> de BA + 0,5 mg L<sup>-1</sup> de KIN com adição de papel de filtro por 1 semana.

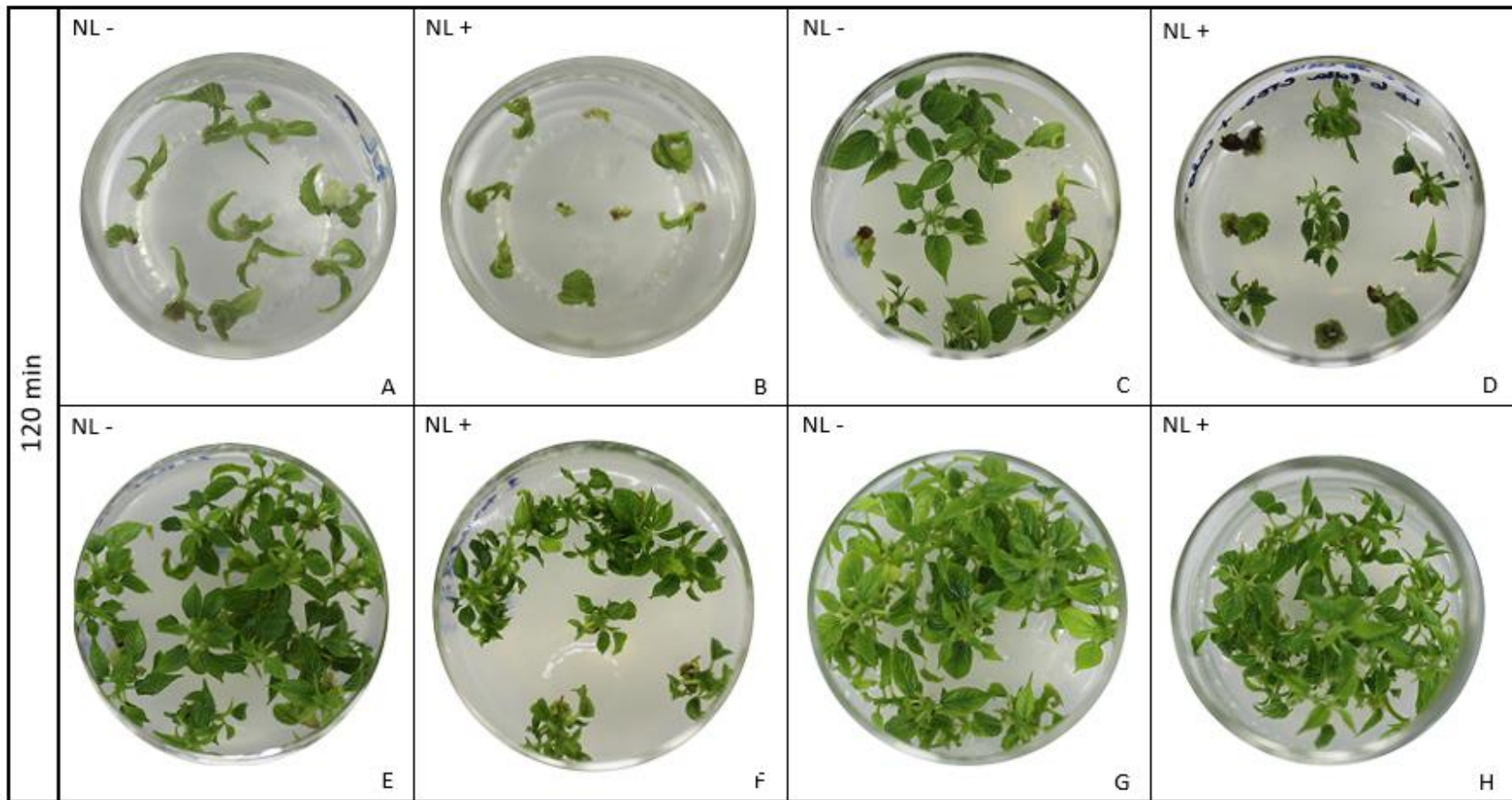
Exposição ao PVS2 (min)	Sobrevivência (%)		Recuperação (%)		Número de brotos / ápice recuperado	
	NL-	NL+	NL-	NL+	NL-	NL+
60	100,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	46,39 ± 8,66 <sup>b</sup>	92,59 ± 3,70 <sup>a</sup>	17,50 ± 0,83 <sup>c</sup>	5,4±1,9 <sup>a</sup>	7,4 ±1,4 <sup>a</sup>
90	96,67 ± 3,33 <sup>a</sup>	77,50 ± 5,77 <sup>a</sup>	80,30 ± 10,15 <sup>a</sup>	39,63 ± 8,02 <sup>b</sup>	2,8 ±0,4 <sup>a</sup>	4,3 ±1,4 <sup>a</sup>
120	97,50 ± 2,89 <sup>a</sup>	68,00 ± 8,66 <sup>ab</sup>	64,91 ± 7,10 <sup>a</sup>	62,00 ± 4,79 <sup>a</sup>	3,1 ±1,0 <sup>a</sup>	4,8 ±0,9 <sup>a</sup>
150	96,67 ± 3,33 <sup>a</sup>	62,50 ± 2,50 <sup>ab</sup>	60,00 ± 7,07 <sup>a</sup>	43,33 ± 3,33 <sup>ab</sup>	3,9 ±0,9 <sup>a</sup>	5,6 ±1,4 <sup>a</sup>

Nota: Os dados representam média ± erro padrão.

Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa entre os tratamentos (p≤0,05) pelo teste de Tukey.



Figura 13 – Desenvolvimento de ápices caulinares de *H. dulcis* criopreservados pela técnica de V-Crioplaca após exposição à solução de PVS2 por 120 min e posterior recultivo sobre papel de filtro em meios MS suplementado com  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de BA +  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de KIN.



Legenda: Após 30 dias de cultivo (A; B); Após 60 dias de cultivo (C; D); Após 90 dias de cultivo (E; F); Após 120 dias de cultivo (G; H).  
 NL-: Controle; NL+: criopreservados.  
 Barra = 1 cm.

O uso de papel de filtro também foi associado à suplementação do meio de recuperação com as citocininas (BA e KIN) na concentração de  $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ . Porém, para esse experimento, foram selecionados apenas os tempos de exposição à PVS2 (90 e 120 min) que resultaram nas maiores taxas de recuperação dos ápices criopreservados no ensaio anterior, no qual foi empregada a concentração de  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  para BA e KIN.

A redução da concentração de citocininas resultou em 100% de sobrevivência e de recuperação para os ápices que foram expostos à PVS2 por 120 min sem o tratamento em NL (NL-) (Tabela 4). Entretanto, para ápices criopreservados (NL+), foi possível observar menores taxas de sobrevivência (62%) e recuperação (37%) quando comparados aos resultados obtidos anteriormente, quando os explantes foram inoculados em meio de recuperação suplementado com  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de BA e  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  KIN, que eram 68% e 63% respectivamente.

Os ápices recuperados em meio MS com menor concentração de BA e KIN apresentaram maior ocorrência de calogênese (5%) comparado com aqueles inoculados no meio MS com maior concentração de BA e KIN (3% de calogênese), embora a resposta ainda fosse pouco expressiva. Após 60 dias de cultivo, as plantas oriundas de ápices criopreservados (NL+) e controles (NL-) mantidas em meio MS com redução da concentração de citocininas apresentaram um desenvolvimento mais lento e suas folhas eram menores e mais estreitas (Figura 14), quando comparadas às plantas matrizes *in vitro* de *H. dulcis*. Como observado nos estudos anteriores, essas plantas também apresentaram característica de multibrotação.

Tabela 4 – Efeito da exposição à PVS2 na sobrevivência e recuperação de ápices caulinares oriundos de microestacas de *H. dulcis*, não criopreservados (NL-) e criopreservados (NL+) pela técnica de V-Crioplaca, após recuperação em meio MS suplementado com  $0,2 \text{ mg L}^{-1}$  de BA +  $0,2 \text{ mg L}^{-1}$  de KIN com adição de papel de filtro por 1 semana.

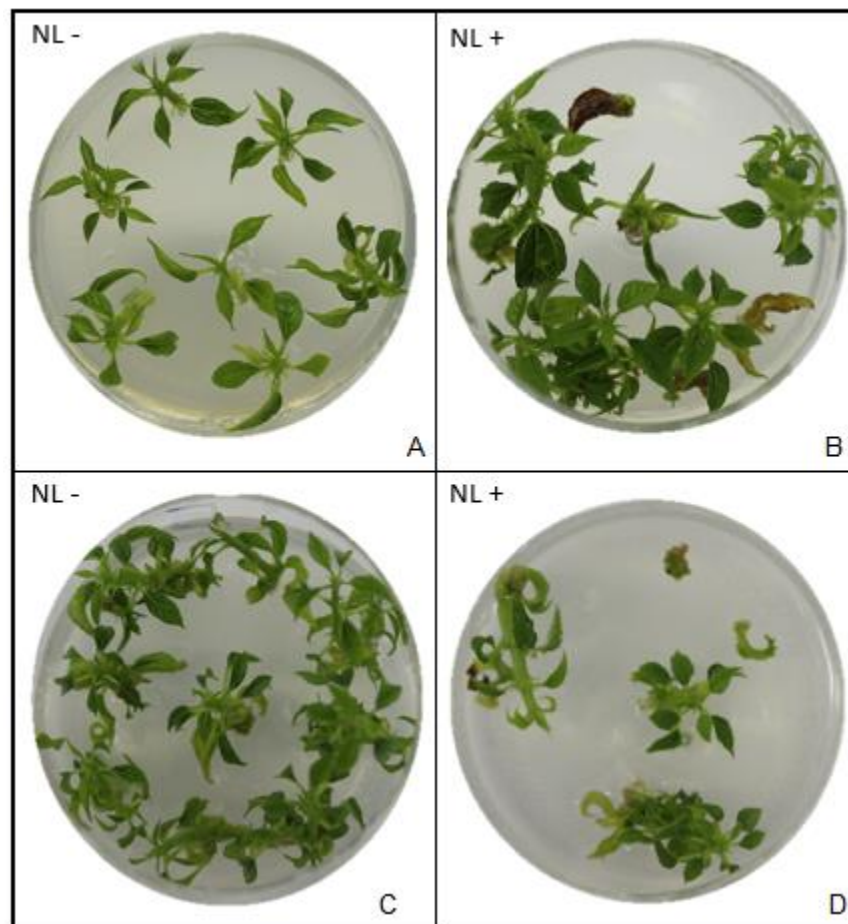
Exposição ao PVS2 (min)	Sobrevivência (%)		Recuperação (%)	
	NL-	NL+	NL-	NL+
90	$83,33 \pm 16,67^a$	$54,44 \pm 14,70^a$	$73,33 \pm 14,53^a$	$35,00 \pm 9,57^a$
120	$100,00 \pm 0,00^a$	$62,50 \pm 6,29^a$	$100,00 \pm 0,00^a$	$37,50 \pm 8,54^a$

Os dados representam média  $\pm$  erro padrão.

Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa entre os tratamentos ( $p \leq 0,05$ ) pelo teste de Tukey.



Figura 14 – Desenvolvimento de ápices caulinares de *H. dulcis* criopreservados pela técnica de V-Crioplaca e utilizando papel de filtro sobre o meio de recuperação contendo  $0,2 \text{ mg L}^{-1}$  BA +  $0,2 \text{ mg L}^{-1}$  KIN, após 60 dias de cultivo.



Legenda: Ápices expostos à solução PVS2 por 90 min (A; B); Ápices expostos à solução PVS2 por 120 min (C; D)

NL-:

Controle;

NL+:

criopreservados

#### 4.2.3 Criopreservação de gemas axilares desenvolvidas nas plantas *in vitro*

Algumas culturas de *H. dulcis* começaram a apresentar quebra da dormência das gemas laterais ao longo do tempo de cultivo. Diante dessa resposta fisiológica, foram separadas duas populações denominadas P1 (plantas sem quebra de dormência das gemas laterais) e P2 (plantas com gemas laterais desenvolvidas), conforme pode ser observado nas Figuras 15A e 15B.

Tendo em vista o comportamento das culturas *in vitro* de *H. dulcis*, o protocolo que resultou nas maiores taxas de sobrevivência e recuperação dos experimentos anteriores, utilizando ápices excisados de microestacas, foi também avaliado para ápices obtidos de brotações laterais oriundas de plantas P2, ou seja, sem o preparo de microestacas. Os explantes não criopreservados apresentaram uma tendência de maiores taxas de sobrevivência (92% a 100%) quando expostos à PVS2 durante 60 a 150 min (Tabela 5). Esses resultados são similares àqueles obtidos para ápices excisados de microestacas.

Por outro lado, para os explantes criopreservados (NL+), apresentaram uma tendência de maiores taxas de sobrevivência (75%) e recuperação (45%) após exposição à PVS2 por 120 min (Tabela 5). Ocorreu uma redução da taxa de recuperação em relação aos ápices derivados de microestacas, que apresentaram 68% e 63% de sobrevivência e recuperação, respectivamente. O uso de papel de filtro sobre o meio de recuperação, também resultou no desenvolvimento de primórdios foliares já na primeira semana da etapa de recuperação. O desenvolvimento de plantas após 30 e 60 dias em cultivo é observado na figura 16.

Figura 15 – Aspecto das plantas propagadas *in vitro* de *H. dulcis* mantidas em estoque após 60 dias em cultivo.



Legenda: P1: Planta com a região de gemas axiliares dormentes, sem desenvolvimento de brotação lateral; P2: Planta com desenvolvimento de parte das gemas laterais. Barra = 1 cm

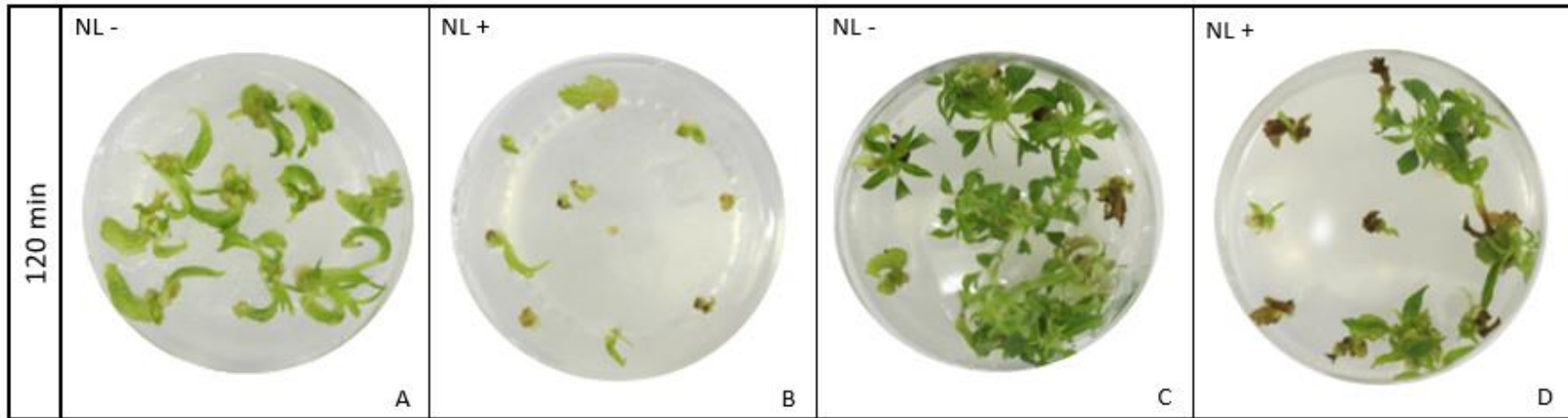
Tabela 5 – Efeito da exposição à PVS2 na sobrevivência e recuperação de ápices caulinares oriundos de plantas matrizes de *H. dulcis*, não criopreservados (NL-) e criopreservados (NL+) pela técnica de V-Crioplaca, após recuperação em meio MS suplementado com  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de BA +  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de KIN com adição de papel de filtro por 1 semana.

Exposição ao PVS2 (min)	Sobrevivência (%)		Recuperação (%)		Número de brotos / ápice recuperado	
	NL-	NL+	NL-	NL+	NL-	NL+
60	100,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	45,00 ± 25,00 <sup>a</sup>	75,00 ± 5,00 <sup>a</sup>	25,00 ± 15,00 <sup>b</sup>	3,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	2,7 ± 1,7 <sup>a</sup>
90	96,67 ± 3,33 <sup>a</sup>	60,00 ± 20,82 <sup>a</sup>	80,56 ± 6,26 <sup>a</sup>	36,67 ± 14,53 <sup>a</sup>	3,3 ± 0,4 <sup>a</sup>	2,8 ± 0,9 <sup>a</sup>
120	92,50 ± 7,50 <sup>a</sup>	75,00 ± 10,41 <sup>a</sup>	62,50 ± 14,36 <sup>a</sup>	45,00 ± 6,45 <sup>a</sup>	4,5 ± 1,3 <sup>a</sup>	3,1 ± 0,3 <sup>a</sup>
150	91,67 ± 8,33 <sup>a</sup>	64,44 ± 12,81 <sup>a</sup>	64,81 ± 24,00 <sup>a</sup>	11,67 ± 7,26 <sup>b</sup>	2,6 ± 1,1 <sup>a</sup>	6,0 ± 2,0 <sup>a</sup>

Os dados representam média ± erro padrão.

Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa entre os tratamentos ( $p \leq 0,05$ ) pelo teste de Tukey.

Figura 16 – Desenvolvimento de ápices caulinares excisados diretamente da planta matriz de *H. dulcis* criopreservados pela técnica de V-Crioplaca após exposição à solução de PVS2 e posterior recultivo sobre papel de filtro em meios MS suplementado com  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de BA +  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de KIN

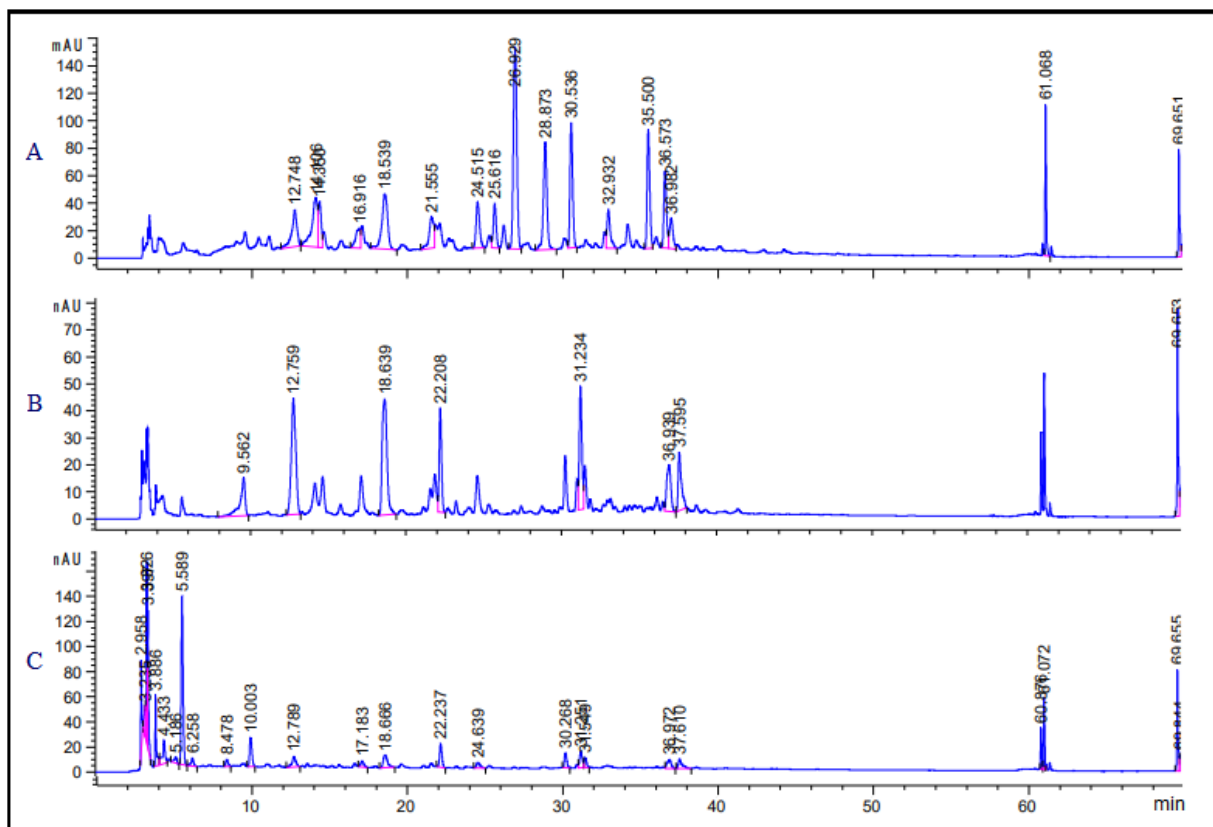


Legenda: Ápices criopreservados após 30 (A; B) e 60 (C; D) dias de cultivo em meio de regeneração; Barra = 1 cm  
NL-: Controle; NL+: criopreservados

### 4.3 Avaliação da capacidade biossintética

Para a comparação dos extratos obtidos a partir de plantas coletadas a campo (FC), plantas mantidas *in vitro* (PV) e plantas oriundas do processo de criopreservação no melhor protocolo encontrado anteriormente (PC), foram realizadas análises por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Inicialmente foi selecionado o comprimento de onda de 254 nm, que permite a visualização de substâncias de diferentes classes químicas. O extrato de folhas de plantas de campo (FC), apresentou o maior número de sinais ao longo da corrida cromatográfica (Figura 17A). Quando analisados os extratos obtidos de materiais *in vitro* (PV e PC), foram observados cromatogramas com um menor número de sinais em relação ao encontrados para FC, sendo alguns em tempos de retenção similares. Considerando apenas os cromatogramas referentes aos extratos dos materiais *in vitro* (PV e PC), foram observados perfis semelhantes, porém com maior intensidade em alguns detectados no extrato de plantas mantidas em culturas estoque (Figura 17B e 17C).

Figura 17– Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD-UV<sub>254nm</sub> de extratos aquosos brutos de *H. dulcis*.

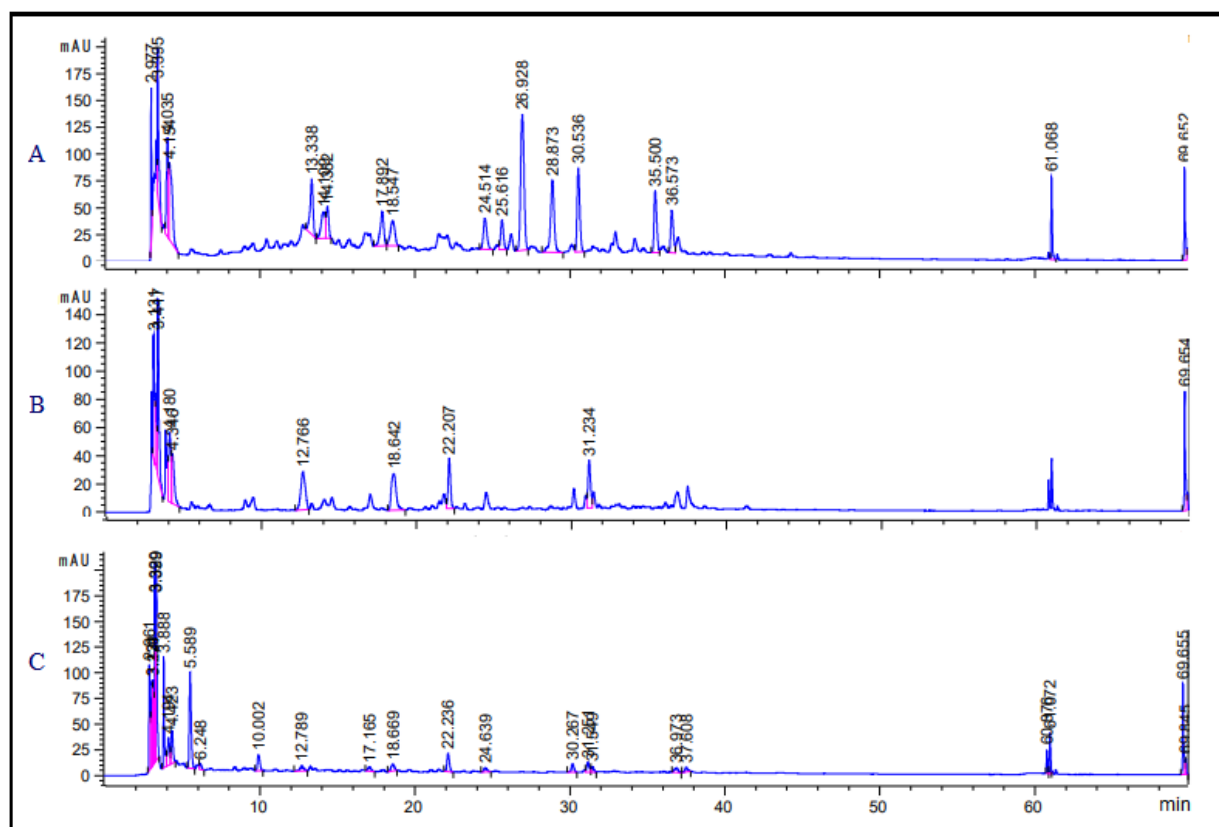


Legenda: Extratos obtidos de folhas coletadas a campo (A), plantas *in vitro* (B) e plantas recuperadas do processo de criopreservação\* (C).

\* Plantas desenvolvidas de ápices caulinares obtidos de microestacas e incubados em PVS2 por 120 min a 0°C seguido pelo tratamento em NL e recuperação sobre papel de filtro em meio MS contendo 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de BA e KIN.

As amostras foram analisadas à 340 nm (Figura 18), uma vez que esse comprimento de onda permite a detecção de substâncias da classe dos flavonoides. Os perfis cromatográficos obtidos sinalizaram a presença de substâncias dessa classe química nos extratos obtidos tanto de material de campo (FC) como material *in vitro* (PV e PC). O extrato FC apresentou maior número de sinais e com maiores intensidades, quando comparado aos materiais *in vitro*. A análise dos espectros de absorção dos sinais com as maiores porcentagens de área relativa nos cromatogramas detectados a 340 nm (Quadro 4 e Quadro 5) mostraram perfil indicativo de substâncias do tipo flavona ou flavonol, principalmente nos extratos de FC (Quadro 4).

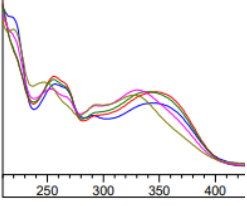
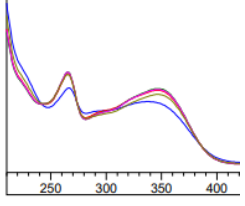
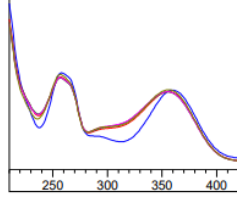
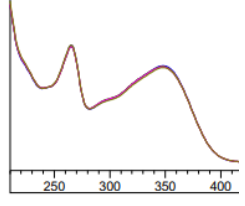
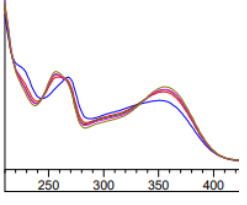
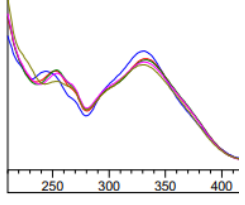
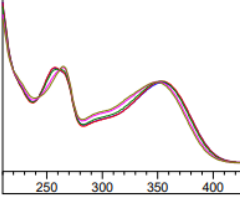
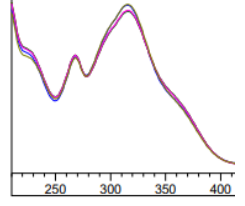
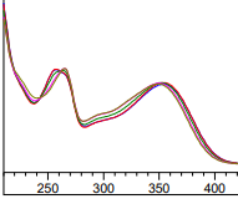
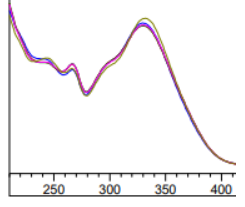
Figura 18 – Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD-UV<sub>340nm</sub> de extratos aquosos brutos de *H. dulcis*



Legenda: Extratos obtidos de folhas coletadas a campo (A), plantas *in vitro* (B) e plantas recuperadas do processo de criopreservação\* (C).

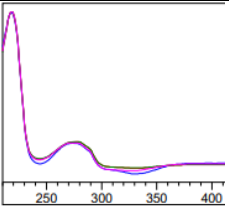
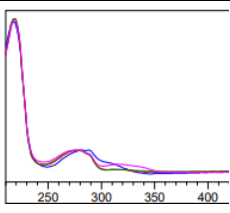
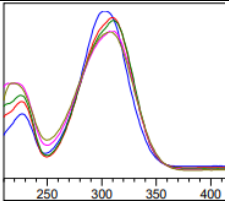
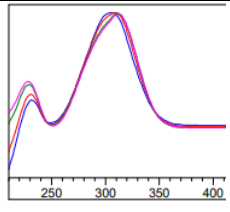
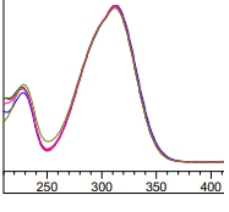
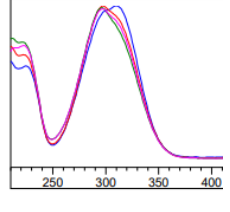
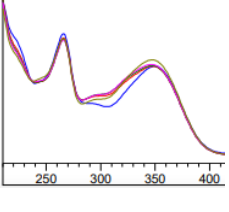
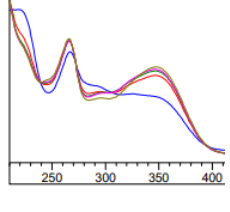
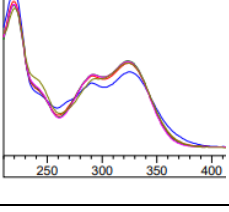
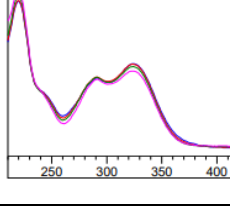
\* Plantas desenvolvidas de ápices caulinares obtidos de microestacas e incubados em PVS2 por 120 min a 0°C seguido pelo tratamento em NL e recuperação sobre papel de filtro em meio MS contendo 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de BA e KIN.

Quadro 5 - Espectros de absorção no UV dos sinais com as maiores porcentagens de área relativa nos cromatogramas obtidos a 340 nm de extratos de parte aérea de plantas de campo de *H. dulcis*.

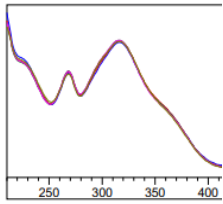
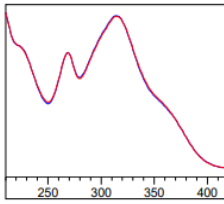
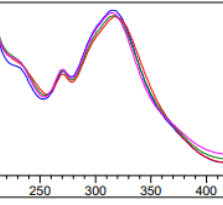
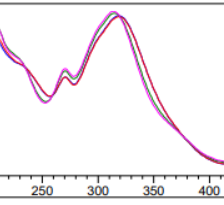
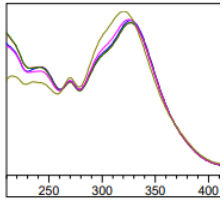
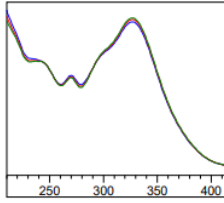
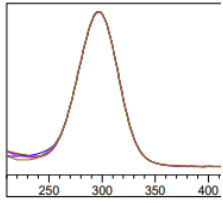
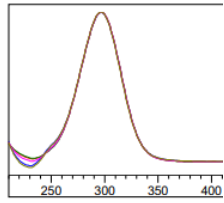
Tempo de retenção (min)	Espectro de UV	Tempo de retenção (min)	Espectro de UV
24.513		28.873	
25.613		30.536	
26.205		34.174	
26.887		35.500	
26.915		36.574	



Quadro 6 - Espectros de absorção no UV dos sinais com as maiores porcentagens de área relativa nos cromatogramas obtidos a 340 nm de extratos de parte aérea de plantas *in vitro* e de plantas recuperadas do processo de criopreservação de *H. dulcis* (Continua).

Plantas matrizes <i>in vitro</i>		Plantas oriundas de criopreservação	
Tempo de retenção (min)	Espectro de UV	Tempo de retenção (min)	Espectro de UV
9.053		9.083	
12.759		12.789	
18.639		18.690	
22.206		22.234	
24.597		24.642	

Quadro 6 - Espectros de absorção no UV dos sinais com as maiores porcentagens de área relativa nos cromatogramas obtidos a 340 nm de extratos de parte aérea de plantas *in vitro* e de plantas recuperadas do processo de criopreservação de *H. dulcis*

31.520		31.549	
36.939		36.972	
37.595		37.610	
60.878		60.876	

A partir dos resultados obtidos nos cromatogramas em 254 nm e 340 nm foi realizada uma comparação das áreas relativas dos sinais com maior intensidade e mesmo tempo de retenção, presentes tanto nas culturas estoque como naquelas oriundas do processo de criopreservação (Quadro 7). Foram detectados oito (254 nm) e nove (340 nm) sinais em mesmo tempo de retenção nos materiais *in vitro*, sendo as maiores áreas relativas observadas nos sinais detectados nos extratos de culturas estoque.

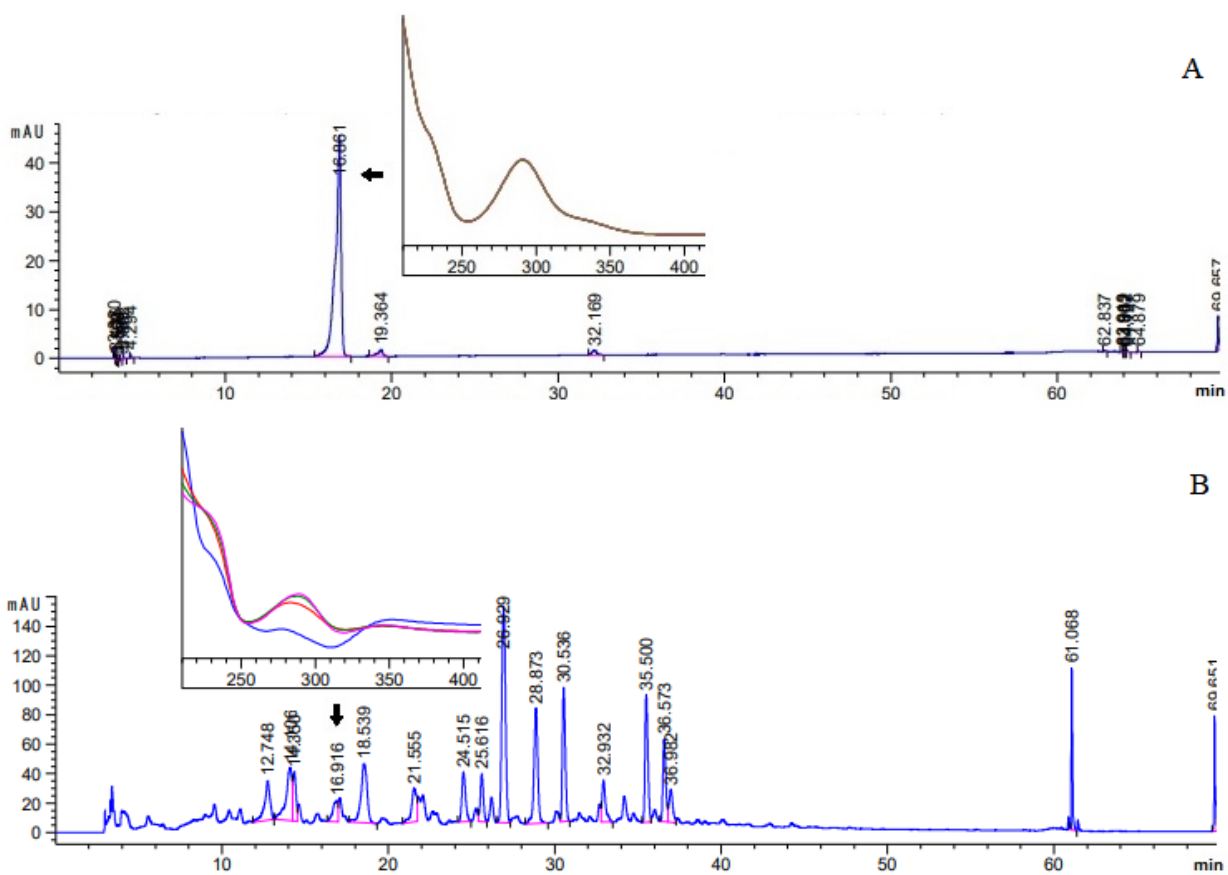
Quadro 7 - Comparação semiquantitativa dos sinais detectados nos cromatogramas obtidos a partir dos extratos de plantas *in vitro* de *H. dulcis*.

		Plantas matrizes <i>in vitro</i>	Plantas oriundas de criopreservação
Comprimento de onda	tR (min)	Área	
254nm	12,759	858,38	142,73
	18,639	929,7	199,27
	22,208	411,3	201,01
	24,599	220,66	70,82
	31,528	163,16	85,45
	36,939	319,56	120,53
	37,595	317,06	124,18
	60,878	140,17	152,36
340nm	9,088	90,95	33,25
	12,789	549,96	84,64
	18,669	562,18	99,93
	22,236	383,63	196,87
	24,639	170,52	55,3
	31,549	114,37	59,29
	36,973	208,22	72,63
	37,608	209,72	51,83
	60,876	95,04	105,48

Legenda: tR\* = Tempo de retenção

Com base nos resultados observados a partir da análise dos extratos de *H. dulcis*, alguns padrões de flavonoides já detectados anteriormente na espécie foram avaliados (rutina, taxifolina, quercetina e ampelopsina). Desses padrões, apenas a ampelopsina, que apresentou sinal em tempo de retenção 16.861 min, possui uma perspectiva de também estar presente no extrato de material de campo, no qual foi detectado um sinal a 16.916 min. A sugestão da presença de ampelopsina no extrato de *H. dulcis* é reforçada pela similaridade do espectro de UV do extrato com o do padrão da substância (Figura 19).

Figura 19 - Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD-UV de padrão Sigma<sup>®</sup> de Ampelopsina (A) e extrato de folha de campo de *H. dulcis* (B), com detalhe do espectro de UV.



## 5 DISCUSSÃO

O presente estudo representa o primeiro trabalho de criopreservação com uma espécie do gênero *Hovenia*, sendo também o primeiro em que o uso de crioplacas foi usada para espécies da família Rhamnaceae. A conservação *in vitro* de espécies arbóreas representa um desafio, uma vez que a maior parte apresenta um ciclo de vida lento e muitas possuem sementes recalcitrantes, o que dificulta seu armazenamento em bancos de sementes. Dessa forma, a criopreservação utilizando ápices caulinares tem se mostrado uma estratégia eficiente para a conservação em longo prazo de espécies arbóreas (LAMBARDI; SHAARAWI et al., 2016).

A técnica de V-Crioplaca utilizada neste trabalho para a criopreservação de ápices caulinares, tem como vantagens o fácil e rápido manuseio do material, além da possibilidade de otimização do número amostral, uma vez que podem ser aderidos até 12 ápices por crioplaca, o que facilita a manipulação dos explantes em conjunto, reduzindo a chance de injúrias mecânicas. Além disso, a alta condutividade térmica do alumínio, material com o qual são produzidas as crioplacas, proporciona uma maior velocidade de resfriamento e reaquecimento do material biológico (KALAISELVI et al., 2017). Essas características são cruciais para protocolos de criopreservação bem sucedidos; além disso, resultam em uma maior taxa de regeneração, quando comparadas às outras técnicas de criopreservação baseadas no resfriamento rápido, como a dessecação, vitrificação, encapsulamento-dessecação e encapsulamento-vitrificação. Por exemplo, a criopreservação de cana-de-açúcar por V-Crioplaca alcançou porcentagens de recuperação de até 100% (RAFIQUE et al., 2015), enquanto técnicas de encapsulamento-desidratação e vitrificação em gotas proporcionaram porcentagens de recuperação de 60% e 37%, respectivamente (BARRACO et al., 2011).

Diferentes materiais *in vitro* têm sido empregados para o estabelecimento de protocolos de criopreservação. No presente estudo, foram usados ápices caulinares de plantas propagadas *in vitro*, os quais são muito utilizados para a conservação em longo prazo de diversas espécies (BEKHEET et al., 2020; NOOR et al., 2019; NIINO et al., 2019; VIANNA et al., 2019). Os ápices caulinares caracterizam-se por conter regiões meristemáticas primárias, ou seja, células capazes de se diferenciar nos três principais tecidos constituintes de uma planta jovem: epiderme, tecidos fundamentais e vasos condutores (EVERT, 2006). As células meristemáticas têm uma grande capacidade proliferativa e possuem pequenos vacúolos que conferem alto potencial de

tolerância osmótica, uma característica importante para o sucesso de protocolos de criopreservação (NOOR et al., 2019; ENGELMANN et al., 2013).

Os ápices caulinares de *H. dulcis* utilizados nos protocolos de criopreservação propostos apresentavam tamanho entre 1,5 - 2,0 mm. O tamanho dos ápices tem influência nos resultados obtidos, uma vez que em explantes menores ocorre maior homogeneidade de desidratação durante as diferentes etapas do processo. Além disso, é interessante notar que, em explantes menores, a porção de células apicais e em estágios fisiológicos meristemáticos, ou mais próximos do estágio meristemático, contribui para uma maior taxa de recuperação (NGUYEN et al., 2000).

No presente estudo, a maior parte dos experimentos foi realizada utilizando-se ápices caulinares obtidos de microestacas preparadas a partir de plantas propagadas *in vitro*. Essa metodologia permitiu a padronização da idade dos ápices, que foram criopreservados após três semanas de cultivo das microestacas. Esse procedimento permite um aumento na quantidade de material disponível para a criopreservação, uma vez que, na maioria das espécies, ocorre o desenvolvimento de apenas um ápice caulinar por planta quando mantida a dominância apical. Além disso, o uso de microestacas como alternativa para fornecimento de explantes para a criopreservação resulta em maior uniformidade do material no mesmo estado fisiológico, aumentando a reprodutibilidade dos protocolos (BETTONI et al., 2019; KULUS; ZALEWSKA, 2014; WANG et al., 2015; POSTMAN et al., 2006; CHAROENSUB et al., 2003).

Além de ápices caulinares excisados de microestacas, a criopreservação de *H. dulcis* também foi realizada usando ápices excisados de brotos axilares obtidos de culturas *in vitro* com 60 dias. A multibrotação observada em algumas culturas pode ser resultado da adição de citocininas ao meio de cultura, uma vez que essa classe de reguladores pode influenciar na quebra da dominância apical (BEYL; TRIGIANO, 2000; PARK et al., 2006). O uso de gemas axilares, além de resultar em uma maior disponibilidade de material para a criopreservação, também possibilita uma redução no tempo de execução dos protocolos, uma vez que elimina a etapa de preparo e desenvolvimento das microestacas. No presente estudo, para esses materiais foi empregado o protocolo mais eficiente previamente estabelecido com ápices caulinares obtidos de microestacas.

Embora os resultados tenham indicado uma taxa de recuperação numericamente maior quando foram utilizados ápices caulinares obtidos de microestacas, não houve uma diferença

significativa quando comparados aos resultados alcançados para ápices excisados à partir de brotos axilares. Entretanto, a imprevisibilidade das características morfogênicas das culturas *in vitro* quanto ao desenvolvimento ou não de brotos laterais ao longo do caule, torna a metodologia com o uso de microestacas a mais adequada e confiável para a criopreservação de *H. dulcis*.

Os protocolos utilizados neste trabalho envolveram a avaliação da etapa de pré-cultivo, considerando a suplementação do meio de cultura com 0,3 M de sacarose por um tempo de exposição de 24h, como utilizado em diversos estudos anteriores (JITSUYAMA et al., 2002; GONZALEZ-ARNAO et al., 2014). De acordo com Sakai e colaboradores (2008), o tempo ideal de pré-cultivo varia principalmente em relação ao tipo e tamanho do explante, e também entre espécies. Para a criopreservação de ápices caulinares de *Prunus cerasifera*, *P. domestica* e *Marchantia polymorpha*, a exposição por 24 h a 0,3 M de sacarose foi a condição de pré-cultivo que resultou nas maiores taxas de recuperação após a criopreservação por V-Crioplaca (VUJOVIĆ et al., 2015; TANAKA et al., 2015). Entretanto, para outras espécies, como por exemplo *Phoenix dactylifera*, foi observada a necessidade de maior tempo de exposição e/ou concentrações mais altas de sacarose durante o pré-cultivo (SALMA et al., 2014). De acordo com os autores, maiores porcentagens de regeneração foram alcançadas quando os explantes de *P. dactylifera* foram cultivados em 0,3 M de sacarose por 72 h (SALMA et al., 2014). Por outro lado, em cana-de-açúcar, o pré-cultivo mais adequado envolveu a exposição dos ápices a uma concentração de sacarose mais elevada (0,5 M) durante 24 h (RAFIQUE et al., 2016). Embora a sacarose seja mais comumente empregada nos protocolos de criopreservação, outros açúcares como a glicose, maltose, manitol e sorbitol também podem ser utilizados (KALAISELVI et al., 2017). Os açúcares estão envolvidos nos mecanismos de resistência das plantas à dessecação, podendo atuar, por exemplo, na substituição da água nas membranas ou na indução do processo de vitrificação intracelular garantindo assim a sobrevivência celular após a criopreservação (DUMET et al., 1994; ENGELMANN, 2013).

Dando continuidade à desidratação gradativa dos ápices de *H. dulcis*, após pré-cultivo e aderência dos ápices às crioplacas, o material foi submetido a uma etapa de osmoproteção em solução a base de sacarose (0,4 M) e glicerol (2 M), denominada solução de *loading*, cuja função é preparar os explantes para a etapa seguinte, aumentando a tolerância do material às soluções de vitrificação (NISHIZAWA et al., 1993). Existem diversas composições de soluções de vitrificação, sendo a PVS2 (SAKAI et al., 1990) e a PVS3 (NISHIZAWA et al. 1993) as mais

comumente utilizadas (PANIS et al., 2018). Essas soluções podem ser utilizadas a diferentes temperaturas, normalmente na temperatura ambiente ou a 0°C. Segundo Volk e colaboradores (2006), os componentes da solução PVS2 são potencialmente tóxicos, durante tempos prolongados de exposição. Especificamente o glicerol, pode causar danos químicos às células tratadas. Além disso, o etilenoglicol e o DMSO apresentariam uma ação surfactante sobre a membrana celular, tornando-a mais porosa e receptiva para a penetração dos outros componentes da solução. Dessa forma, a utilização da PVS2 à temperatura de 0°C acarretaria em uma redução, tanto na velocidade de penetração como na mobilidade dessas substâncias nas células, reduzindo os efeitos tóxicos causados por seus componentes. No presente trabalho, a desidratação com PVS2 por 120 min a 0°C resultou na maior taxa de recuperação (62%) dos ápices criopreservados. Um longo tempo de exposição à PVS2 também foi necessário para a criopreservação de outras espécies lenhosas, como *Carica papaya* L., que apresentou 90% de recuperação após 80 min de exposição ao PVS2 25°C seguido pelo protocolo de vitrificação (YUAN-LONG et al. 2005) e para *Z. jujuba*, uma espécie também pertencente à família Rhamnaceae, que atingiu 75% de recuperação após 90 min de exposição ao PVS2 a 0°C seguido pelo protocolo de vitrificação em gotas (WANG et al. 2015). Por outro lado, para outras espécies lenhosas, os protocolos de criopreservação foram mais eficientes com o uso de curtos tempos de exposição ao PVS2. Por exemplo, para *Araucaria angustifolia*, criopreservada com a técnica de vitrificação, a maior taxa de recuperação (35%) foi alcançada após 15 min de imersão em PVS2 a 0°C (PRUDENTE et al., 2014), enquanto que para *Persea americana* Mill., com a técnica de vitrificação, uma exposição de 20 a 25 min em PVS2 a 0°C foi o tratamento mais eficiente para a recuperação de (73%) (O'BRIEN et al., 2020) e *Garcinia mangostana* (50%) (IBRAHIM; NORMAH 2013). Esses resultados demonstram que a tolerância dos explantes à solução de vitrificação varia entre as espécies, dimensão de propágulo, protocolos de criopreservação e, ainda, temperatura do PVS2. Períodos de exposição mais longos à PVS2 normalmente são mais eficazes quando a solução é utilizada a baixa temperatura (0°C), já que isso reduz a velocidade de penetração e, conseqüentemente, o estresse osmótico e/ou a toxicidade química (SAKAI et al., 1990; KALITA et al., 2012; MENON et al., 2012).

O desenvolvimento de calos após o processo de criopreservação foi observado em alguns ápices caulinares de *H. dulcis*. Além disso, algumas plantas regeneradas a partir de ápices criopreservados apresentaram características de hiperhidricidade, como a ocorrência de folhas



mais alongadas, retorcidas e de coloração mais clara. A calogênese e, principalmente, a hiperhidricidade frequentemente são características de culturas mantidas em meios de cultivo suplementados com elevada concentração de citocininas (WYBOUW; DE RYBEL, 2019). Um dos efeitos biológicos das citocininas é a proliferação celular, o que muitas vezes é considerado em experimentos *in vitro*, visando à indução da calogênese (WYBOUW; DE RYBEL, 2019). A ocorrência de calogênese também foi reportada durante o estabelecimento de protocolos de criopreservação de ápices caulinares de *Grevillea scapigera* (TOUCHELL et al., 1992; LAMBARDI et al., 2000), enquanto a hiperhidricidade foi observada em *Populus alba* e *Thymus moroderi*, sendo essa resposta mais intensa quando os meios de recuperação foram suplementados com altas concentrações de citocininas (LAMBARDI et al., 2000; MARCO-MEDINA et al., 2010). Isso pode justificar a ocorrência dessa resposta morfogênica eventual, nas culturas de *H. dulcis* após a criopreservação.

A etapa de recuperação nos protocolos de criopreservação compreende na avaliação da regeneração do material, considerando a retomada do crescimento e desenvolvimento. Essa etapa é influenciada por diversos fatores, com destaque para a luminosidade, o tipo e a concentração de fitorreguladores no meio de cultura e a velocidade do processo de reidratação (TOWILL, 2002). Neste trabalho, a exposição à luz foi feita de forma gradual, com o material sendo mantido no escuro por um período de 7 dias, seguido pela exposição à luz difusa e, finalmente, à luz padrão usada no cultivo das culturas estoque. A exposição gradual à luz após o reaquecimento pode aumentar a recuperação do material criopreservado reduzindo o estresse associado à foto-oxidação (BENSON, 1990). Segundo Harding e colaboradores (2009), a foto-oxidação é um evento de estresse oxidativo que está ligado à resposta de perda de competência morfogênica e à morte celular precoce, sendo causada principalmente pela indução da absorção do excesso de energia de excitação, levando à redução das cadeias de transporte de elétrons e gerando espécies reativas de oxigênio (ERO). Contudo, algumas espécies não necessitam dessa proteção da luminosidade inicial, como foi observado na criopreservação de *Ribes nigrum* utilizando um protocolo de resfriamento lento (RANTALA et al., 2019).

A suplementação do meio de recuperação com citocininas foi essencial para a regeneração dos ápices caulinares de *H. dulcis* após a criopreservação. Para isso, foi utilizada uma associação de BA e KIN, uma vez que a combinação dessas citocininas já foi empregada com sucesso na micropropagação da espécie (CASTRO, 2001). Alguns eventos prejudiciais

relacionados à criopreservação, como lesão de membranas e comprometimento do metabolismo primário, podem afetar a restauração pós-reaquecimento da função hormonal normal da planta (Benson 1990). Portanto, o uso de fitorreguladores pode ser utilizado como ferramenta para auxiliar na reativação de processos metabólicos interrompidos durante a criopreservação, bem como para promover a retomada da capacidade de desenvolvimento dos explantes criopreservados (TOUCHELL et al., 2002). Para ápices caulinares de *H. dulcis*, os resultados mais expressivos na recuperação foram obtidos na presença da combinação de BA e KIN na concentração de 0,5 mg L<sup>-1</sup>. Diferentes citocininas têm sido empregadas em meios de cultura de regeneração pós-criopreservação para diversas espécies, especialmente BA. Por exemplo, para *Cleome rosea* a presença de BA, mesmo em baixa concentração (0,1 mg L<sup>-1</sup>), resultou em um aumento da taxa de recuperação dos ápices criopreservados com a técnica de V-crioplaca, passando de 43% quando BA não foi adicionado no meio de regeneração para 100% quando adicionado (CORDEIRO et al., 2015). Já para ápices caulinares de *Ipomoea batatas*, criopreservados por encapsulamento-vitrificação, o uso de BA na concentração de 0,5 mg L<sup>-1</sup> por sete dias, seguido pela transferência de explantes para meio de cultura contendo 0,5 mg L<sup>-1</sup> ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) resultou nas maiores porcentagens de recuperação (80%) (HIRAI; SAKAI, et al., 2003).

A reidratação do material pós-criopreservação é outro fator determinante para a recuperação de explantes criopreservados. Essa etapa deve ser realizada, assim como a desidratação, por um processo gradual que se inicia pela exposição do material a uma solução de alta osmolaridade (solução *unloading*), contendo 1,2 M de sacarose dissolvida em meio MS líquido, e continua com a transferência dos explantes para o meio de recuperação. Ápices de *H. dulcis* apresentaram maiores taxas de recuperação quando foram cultivados em meio de recuperação sobre uma folha de papel de filtro; tal estratégia permite uma passagem mais gradativa da água presente no meio de cultura para o explante. Da mesma forma, para as espécies *Crataeva nurvala* (SANAYAIMA et al., 2006), *D. deltoidea* (MANDAL; DIXIT-SHARMA, 2007) e *Colocasia esculenta* (SANT et al., 2008) esse procedimento também resultou em uma maior regeneração de explantes após a criopreservação.

Os estudos realizados com *H. dulcis* permitiram o estabelecimento de um protocolo de criopreservação que resultou na recuperação de 63% dos ápices criopreservados, sendo esse estudo de criopreservação inédito para o gênero *Hovenia*. Na família Rhamnaceae, apenas *Z.*

*jujuba* já havia sido avaliada quanto à conservação por criopreservação, tendo sido alcançada uma taxa de recuperação de 75% em de ápices caulinares criopreservados com o uso da técnica de vitrificação em gotas (WANG et al., 2015).

A estabilidade biossintética de plantas medicinais após o processo de criopreservação é extremamente importante para a determinação do sucesso do processo, permitindo a manutenção da capacidade de produção de moléculas bioativas que podem ser usadas na fabricação ou como base para a produção de drogas (AHUJA et al., 2002). O número de estudos com esse objetivo tem aumentado significativamente nos últimos 20 anos (DIXIT-SHARMA et al. 2005; SKYBA et al. 2010; KRISHNAN et al. 2011; BI et al., 2016; VILARDO, 2019a; KULUS et al., 2020). Em *D. floribunda*, a comparação de perfis cromatográficos demonstrou a manutenção da produção de uma substância bioativa do grupo das saponinas, a diosgenina, em plantas obtidas a partir do processo de criopreservação pela técnica de vitrificação (AHUJA et al., 2002). Um estudo comparativo sobre a produção de flavonoides em plantas de *Allium cepa* var. *aggregatum* aclimatizadas após o processo de criopreservação por vitrificação em gotas e culturas estoque não detectou variação significativa nas substâncias monitoradas (WANG et al., 2021). Da mesma forma, não foram observadas diferenças entre os níveis de antocianinas e carotenoides em flores de plantas de crisântemo derivadas de criopreservação e em culturas estoque *in vitro* (KULUS et al., 2019). Por outro lado, em *Lamprocapnos spectabilis* foi reportada a redução da produção de metabólitos primários como as clorofilas a e b em plantas recuperadas do processo de criopreservação pela técnica de encapsulamento-vitrificação (KULUS et al., 2020). No mesmo trabalho, a criopreservação da espécie pelas técnicas de vitrificação e vitrificação em gotas resultou em um estímulo para a produção de pigmentos do grupo das antocianinas (KULUS et al., 2020). A possibilidade de alterações na produção de metabólitos em função da ocorrência de modificações genéticas em plantas recuperadas do processo criogênico tem sido relatada por Martín e colaboradores (2011) em estudos com o híbrido *Chrysanthemum* × *morifolium* Ramat criopreservado por encapsulamento-desidratação. Da mesma forma, Hitmi e colaboradores (1997), observaram o aumento na produção de piretrina, substância inseticida, em plantas de *C. cinerariaefolium* Vis. criopreservadas por resfriamento lento quando comparadas às plantas matrizes.

As análises realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência demonstraram a existência de uma diversidade de substâncias nos extratos de *H. dulcis*. A comparação do perfil

fitoquímico das plantas *in vitro* usadas como culturas estoque e das plantas recuperadas após a criopreservação revelou similaridades nos sinais obtidos em tempos de retenção muito próximos, sugerindo uma estabilidade biossintética dos materiais oriundos do processo criogênico. Entretanto, os materiais obtidos *in vitro* apresentaram sinais com menor número, intensidade e área relativa, quando comparados ao material de campo. Resultados semelhantes foram observados por Bi e colaboradores (2016), na comparação de materiais *in vivo* e *in vitro* de *C. morifolium*.

A maior riqueza de metabólitos em materiais *in vivo* pode estar relacionada ao fato de que as plantas a campo estão expostas a diversos fatores de estresse, tanto bióticos quanto abióticos, que modulam a produção de metabólitos secundários, como forma de interação com o ambiente (GANDHI et al., 2015). Por outro lado, embora o cultivo *in vitro* também seja uma condição que leva ao estresse, a disponibilidade no meio de cultura das substâncias necessárias ao crescimento e desenvolvimento das plantas pode influenciar a produção de metabólitos, reduzindo ou mesmo interrompendo a síntese de algumas dessas substâncias (ESPINOSA-LEAL et al., 2018). Por sua vez, as diferenças de intensidade dos sinais dos extratos de plantas derivadas da criopreservação quando comparados aos extratos de plantas mantidas como culturas estoque *in vitro*, podem estar relacionadas à recuperação do material ao processo criogênico, durante o qual o metabolismo é direcionado principalmente para os processos essenciais ao desenvolvimento do vegetal.

A maior parte dos sinais detectados nos extratos de *H. dulcis* a 340 nm apresentaram espectros de absorção compatíveis com substâncias fenólicas, sendo esses espectros, em sua maioria, caracterizados pela presença de dois picos. Os flavonoides possuem um perfil de espectro de absorção caracterizado pela presença de dois ou três picos de absorção, que estão relacionados à sua estrutura química, quantidade de cromóforos e tipos de ressonância da molécula. Flavonas ou flavonois, apresentam um espectro de UV com três picos distintos, já que são flavonoides que possuem uma ligação sigma ( $\sigma$ ) e uma ligação pi ( $\pi$ ), representada pela dupla ligação em seu segundo anel aromático (SIMOES et al., 2016). Já substâncias do grupo das flavanonas e dihidroflavonois apresentam um espectro de UV com dois picos característicos, uma vez que os elétrons de seus anéis aromáticos, possuem apenas um núcleo de ressonância ocasionado pela falta da dupla ligação entre o seu segundo e terceiro anéis aromáticos (PAVIA et al., 2012).

Flavonoides com importantes atividades biológicas já foram identificados em *H. dulcis*, incluindo ampelopsina (PARK et al., 2017), quercetina (MENG et al., 2016), rutina (PARK et al., 2017), taxifolina (NGO et al., 2021) e mirecetina (MENG et al., 2016). No presente estudo, as substâncias ampelopsina, quercetina, rutina e taxifolina foram usadas como padrão nas análises cromatográficas. A presença de ampelopsina foi sugerida no extrato de plantas de campo. Esse flavonoide é considerado responsável por muitas das propriedades biológicas atribuídas à espécie (SFERRAZZA et al., 2021), como antineoplásica (ZENG et al., 2004), anti-inflamatória (QI et al., 2012), antioxidante (HOU et al., 2014), hepatoprotetora (OSHIMA et al., 1995; MURAKAMI et al., 2004) e antimicrobiana (XIONG et al., 2000; XIAO et al., 2019).

Os estudos aqui realizados com *H. dulcis* viabilizaram a conservação em longo prazo da espécie, assim como permitiram avaliar a estabilidade biossintética das plantas oriundas do processo de criopreservação. Os resultados alcançados neste trabalho, parcialmente publicados em revista especializada no cultivo vegetal *in vitro*, poderão contribuir com os estudos biotecnológicos de outras espécies arbóreas, principalmente para espécies da família Rhamnaceae.

## CONCLUSÕES

A criopreservação é um método eficiente para a conservação de *Hovenia dulcis*. Pela primeira vez, ápices caulinares foram criopreservados com sucesso utilizando a técnica de V-Crioplaca. A padronização do tempo de cultivo das plantas do estoque *in vitro* com o uso de microestacas, o uso de pré-tratamento em meio de cultura com 0,3 M de sacarose por 24 horas e a otimização do tempo de exposição dos explantes à solução de vitrificação PVS2 por 120 min (0°C), foram determinantes para os resultados encontrados. Além disso, a suplementação com 0,5 mg L<sup>-1</sup> das citocininas BA e KIN, assim como o uso de papel de filtro sobre o meio de cultura por 7 dias, se mostraram estratégias decisivas para o sucesso dos ensaios de criopreservação descritos aqui. Considerando o potencial medicinal da espécie, os perfis cromatográficos semelhantes de plantas recuperadas do processo de criopreservação e culturas estoque *in vitro*, sugerem que as metodologias propostas foram eficientes para a criopreservação e estabilidade biossintética de *Hovenia dulcis*.

## PERSPECTIVAS

Será dado prosseguimento aos estudos de avaliação biossintética dos extratos preparados com materiais das três origens (folhas coletadas a campo, parte aérea de plantas *in vitro* e plantas recuperadas do processo de criopreservação), no intuito de isolar e identificar substâncias presentes nesses materiais, com ênfase nas plantas recuperadas do processo de criopreservação.

## REFERÊNCIAS

- ABDULLAHIL, B., SANG-HYUN, M., EUN-JUNG L., JIAN-JIANG Z., KEE-YOEUP P. Production of biomass and useful compounds from adventitious roots of high-value added medicinal plants using bioreactor. **Biotechnology Advances**, v.30 p.1255-1267. 2012.
- ABELI, T., DALRYMPLE, S., GODEFROID, S., MONDONI, A., MÜLLER, J. V., ROSSI, G., ORSENIGO, S. *Ex situ* collections and their potential for the restoration of extinct plants. **Conservation Biology**, n.34, v.2, p.303-313, 2020.
- ACHAN, J. T. A., O., ERHART, A., YEKA, A., TIBENDERANA, J. K., BALIRAINÉ, F. N., D'ALESSANDRO, U. Quinine, an old anti-malarial drug in a modern world: role in the treatment of malaria. **Malaria journal**, v. 10, n. 1, p. 1-12, 2011.
- ACOSTA, Y., PÉREZ, L., LINARES, C., HERNÁNDEZ, L., ESCALANTE, D., PÉREZ, A., FONTES, D. Effects of *Teramnus labialis* (Lf) Spreng seed cryopreservation on subsequent seed and seedling growth and biochemistry. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 42, n. 1, p. 1-7, 2020.
- ADU-GYAMFI, R., WETTEN, A., LOPEZ, C. M. R. Effect of cryopreservation and post-cryopreservation somatic embryogenesis on the epigenetic fidelity of cocoa (*Theobroma cacao* L.). **PLoS one**, v. 11, n. 7, 2016.
- AHUJA, S., MANDAL, B. B., DIXIT, S., SRIVASTAVA, P. S. Molecular, phenotypic and biosynthetic stability of plants recovered from cryopreserved shoot-tips of *Dioscorea floribunda*. **Plant Sciences**, v. 3, p. 971-977, 2002.
- ALBARELLO, N., RIBEIRO I.G., COELHO, M.G.P., CASTRO, T.C. Processo para obtenção de fração de saponinas de *Hovenia dulcis* a partir de culturas do tipo CCC (Compact callus clusters) e produto que compreende uma fração de saponinas. Patente. BR1020140233105. Depósito: 19/09/2014
- ALSOUFI, A. S. M., PAÇKOWSKI, C., SZAKIEL, A., DŁUGOSZ, M. Effect of jasmonic acid and chitosan on triterpenoid production in *calendula officinalis* hairy root culture. **Phytochemistry Letters**. n.31, p. 5-11, 2019.
- ANASTÁCIOL, H., FERNANDES P., MARISTELA R., CARNEIROI, P., A., P., Aplicações da cultura de tecidos vegetais em fruteiras do Cerrado. **Ciência Rural**, v.41 n.7 p.1136-1142, 2011.
- ANDRADE-NETO, V. F., BRANDÃO, M. G. L., NOGUEIRA, F., ROSÁRIO, V. E., KRETTLI, A. U. *Ampeloziziphus amazonicus* Ducke (Rhamnaceae), a medicinal plant used to prevent malaria in the Amazon Region, hampers the development of Plasmodium berghei sporozoites. **International Journal for Parasitology**, v. 38, n. 13, p. 1505-1511, 2008.
- ANDRAWS, R., CHAWLA, P., BROWN, D. L. Cardiovascular effects of ephedra alkaloids: a comprehensive review. **Progress in cardiovascular diseases**, n.47, v.4, p. 217-225. 2005.
- ANTONY, J. J. J., ZAKARIA, S., ZAKARIA, R., UJANG, J. A., OTHMAN, N., SUBRAMANIAM, S. Biochemical analyses of Dendrobium Sabin Blue PLBs during cryopreservation by vitrification. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 25, n. 6, p. 1457-1467, 2019.

- AUGUSSEAU, X., NIKIÉMA, P., TORQUEBIAU, E. Tree biodiversity, land dynamics and farmers' strategies on the agricultural frontier of southwestern *Burkina Faso*. **Biodiversity & Conservation**, v.15 n.2, p.613-630, 2006.
- ARAÚJO, L. B. D., CAL, B. B., NUNES, B. M., CRUZ, L. O., SILVA, C. R., CASTRO, T. C., DANTAS, F. J. Nuclear and mitochondrial genome instability induced by fractions of ethanolic extract from *Hovenia dulcis* Thunberg in *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 93, 2021.
- ASSAREH, M., H., SARDABI, H. Macropropagation and micropropagation of *Ziziphus spinachristi*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 5, p. 459-465, 2005.
- BAENAS, N., GARCÍA-VIGUERA, C., MORENO, D. A. Elicitation: a tool for enriching the bioactive composition of foods. **Molecules**, v. 19, n. 9, p. 13541-13563, 2014.
- BARRACO, G., SYLVESTRE, I., ENGELMANN, F. Comparing encapsulation-dehydration and droplet-vitrification for cryopreservation of sugarcane (*Saccharum* spp.) shoot tips. **Scientia Horticulturae**, v. 130, p. 320-324, 2011.
- BASTOS, N. R. A. Família Rhamnaceae R. Br. no Rio Grande do Sul. Gêneros: Colubrina Rich. ex Brongn., Gouania Jacq. e *Hovenia* Thunb. Pesquisas – Série. **Botânica**, São Leopoldo, n. 41, p. 99-121, 1990.
- 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, n. 1, p. 1–8, 2020.
- BELOKUROVA, V. B. Methods of biotechnology in system of efforts aimed at plant biodiversity preservation. **Cytology and genetics**, v. 44, n. 3, p. 174-185, 2010.
- BENAMAR, H., RARIVOSON, E., TOMASSINI, L., FREZZA, C., MAROUF, A., BENNACEUR, M., NICOLETTI, M. Phytochemical profiles, antioxidant and anti-acetylcholinesterase activities of the leaf extracts of *Rhamnus lycioides* subsp. *oleoides* (L.) Jahand. & Maire in different solvents. **Natural product research**, v. 33, n. 10, p. 1456-1462, 2019.
- BEN-AMAR, A., DALDOUL, S., ALLEL, D., REUSTLE, G., MLIKI, A. Reliable encapsulation-based cryopreservation protocol for safe storage and recovery of grapevine embryogenic cell cultures. **Scientia Horticulturae**, v. 157, p. 32-38, 2013.
- BENELLI, C. Plant Cryopreservation: A Look at the Present and the Future. **Plants**, v. 10, n. 12, p. 2744, 2021.
- BENSON, E., E. Cryopreservation Theory. In: REED, BM. (Ed.) **Plant Cryopreservation - A Practical Guide**. New York, USA: Springer, p. 15-32, 2008.
- BENSON, E. E. Free radical damage in stored plant germplasm. **Bioversity International**, 1990.
- BERGTOLD, J. S., RAMSEY, S., MADDY, L., WILLIAMS, J. R. A review of economic considerations for cover crops as a conservation practice. **Renewable Agriculture and Food Systems**, v. 34, n. 1, p. 62-76, 2019.



- BETTONI, J. C., COSTA, M. D., GARDIN, J. P. P., KRETZSCHMAR, A. A., PATHIRANA, R. Cryotherapy: a new technique to obtain grapevine plants free of viruses. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 38, 2016.
- BETTONI, J. C., KRETZSCHMAR, A. A., BONNART, R., SHEPHERD, A., VOLK, G. M. Cryopreservation of 12 *Vitis* species using apical shoot tips derived from plants grown *in vitro*. **HortScience**, v. 54, n. 6, p. 976-981, 2019.
- BETTONI, J. C., BONNART, R., VOLK, G. M. Challenges in implementing plant shoot tip cryopreservation technologies. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 144, n. 1, p. 21-34, 2021.
- BEYL, C. A., TRIGIANO, R. N. Getting Started with Tissue Culture: Media Preparation, Sterile Technique, and Laboratory Equipment. In: **Plant Propagation Concepts and Laboratory Exercises**. CRC Press, p. 351-364. 2008.
- BI, W. L., PAN, C., LIU, J., WANG, Q. C. Greenhouse performance, genetic stability and biochemical compounds in *Chrysanthemum morifolium* 'Hangju' plants regenerated from cryopreserved shoot tips. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 38, n. 11, p. 1-10, 2016.
- BOURGAUD, F., GRAVOT, A., MILESI, S., GONTIER, E. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. **Plant science**, v. 161, n. 5, p. 839-851, 2001.
- BROWER, V. Back to nature: extinction of medicinal plants threatens drug discovery. **Journal of the National Cancer Institute**, v.100, n.12, p. 838-839, 2008.
- CAI, J., SHI, G., ZHANG, Y., ZHENG, Y., YANG, J., LIU, Q., ZHANG, Z. Taxifolin ameliorates DEHP-induced cardiomyocyte hypertrophy via attenuating mitochondrial dysfunction and glycometabolism disorder in chicken. **Environmental Pollution**, v. 255, p. 113155, 2019.
- ÇALIŞKAN, T., HATIPOĞLU, R., KIRICI, S. Production of Plant Secondary Metabolites from Cell and Organ Cultures under *In vitro* Conditions. **Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology**, v. 7, n. 7, p. 971-980, 2019.
- CANHOTO, J.M. Biotecnologia Vegetal da Clonagem de Plantas à Transformação Genética. Coimbra: **Imprensa da Universidade de Coimbra**, 407 p., 2010.
- CARVALHO, Paulo Ernani Ramalho. Ecologia, silvicultura e usos da Uva-do-japão (*Hovenia dulcis* Thunberg). **Embrapa Florestas-Circular Técnica** (INFOTECA-E), 1994.
- CASTRO, T. C. D., PELLICCIONE, V. L. B., FIGUEIREDO, M. R., SOARES, R. O. D. A., BOZZA, M. T., VIANA, V. R. C., FIGUEIREDO, S. F. L. Atividade antineoplásica e tripanocida de *Hovenia dulcis* Thunb. cultivada *in vivo* e *in vitro*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.12, p.96-99, 2002.
- CASTRO, T. C. Germinação, micropropagação e perfil fitoquímico por CLAE da espécie medicinal *Hovenia dulcis* Thunb. **Dissertação de Mestrado**, Programa de Pós-Graduação em Biociências nucleares, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2001.
- CHANG, Y., REED, B., M. Extended alternating-temperature cold acclimation and culture duration improve pear shoot cryopreservation. **Cryobiology**, v. 40, n. 4, p. 311-322, 2000.

- CHAROENSUB, R., PHANSIRI, S., YONGMANITCHAI, W., SAKAI, A. Routine cryopreservation of *in vitro*-grown axillary apices of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) by vitrification: importance of a simple mononodal culture. **Scientia Horticulturae**, v. 98, n. 4, p. 485-492, 2003.
- CHEN, H., WANG, J., LIU, X., ZHOU, A., XIAO, J., HUANG, K., CAO, Y. Optimization in continuous phase-transition extraction of crude flavonoids from finger citron fruit and evaluation on their antiaging activities. **Food Science & Nutrition**, v. 8 n. 3, p.1636-1648, 2020.
- CHETVERIKOVA, E. P. DNA Damage by Reactive Oxygen Species in Cryopreservation and the Antioxidant Properties of Cryoprotectors. **Biophysics**, v. 57, n. 2, p. 263-269, 2012.
- CHIVIAN, E. Biodiversity: its importance to human health. Center for Health and the Global Environment, **Harvard Medical School**, Cambridge, v. 23, 2002.
- CHO, J. Y., MOON, J. H., PARK, K. H. Isolation and identification of 3-methoxy-4-hydroxybenzoic acid and 3-methoxy-4-hydroxycinnamic acid from hot water extracts of *Hovenia dulcis* Thunb and confirmation of their antioxidative and antimicrobial activity. **Korean Journal of Food Science and Technology**, v. 32, n. 6, p. 1403–1408,2000.
- CHO, J. Y., HYUN, S. H., MOON, J. H., PARK, K. H. Isolation and structural determination of a novel flavonol triglycoside and 7 compounds from the leaves of oriental raisin tree (*Hovenia dulcis*) and their antioxidative activity. **Food Science and Biotechnology**, v. 22, n. 1, p. 115-123, 2013.
- CLEMENT, C. R., ROCHA, S. F. R., COLE, D. M., VIVAN, J. L. Conservação *on farm* in **Recursos genéticos vegetais**, p. 511–543, 2007.
- COHEN, D. The culture medium. Environmental Effects and their Control in Plant Tissue Culture 393, p. 15-24, 1994.
- CORDEIRO, L., SIMÕES-GURGEL, C., ALBARELLO, N., ENGELMANN, F. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of *Cleome rosea* Vahl (Cleomaceae) using the V cryo-plate technique. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 51, n. 6, p. 688-695, 2015.
- COSTA, O. A. *Hovenia dulcis* Thunb. Família das Rhamnaceas. **Revista de Flora Medicinal**, v.1, n.1, p. 230-239, 1934.
- COZZO, D. Resultados de las plantaciones florestais com *Hovenia dulcis* en ia region Argentina subtropical y húmeda de Misiones. **Revista Forestal Argentina**, v.4, n.4, p.107-117, 1960.
- CRUZ-CRUZ, C. A., GONZÁLEZ-ARNAO, M. T., ENGELMANN, F. Biotechnology and Conservation of Plant Biodiversity. **Resources**, v. 2, p. 73-95, 2013.
- DANIELL, H., STREATFIELD, S. J., WYCOFF, K. Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. **TRENDS in Plant Science** v.6, n.5, 2001.
- DE ARAUJO GOMES, R. B., DE SOUZA, E. S., BARRAQUI, N. S. G., TOSTA, C. L., NUNES, A. P. F., SCHUENCK, R. P., KUSTER, R. M. Residues from the Brazilian pepper tree (*Schinus terebinthifolia* Raddi) processing industry: Chemical profile and antimicrobial activity of extracts against hospital bacteria. **Industrial Crops and Products**, v.143, 111430, 2020.

- DE MOURA, D. F., MARTINS, R. D., DA SILVA, M. V. Nerolidol: Fitoconstituente de Óleos Essenciais de Plantas da Caatinga/Nerolidol: Phytoconstituent of Essential Oils of Caatinga Plants. **Brazilian Journal of Development**, v. 5, n. 12, p. 33402-33416, 2019.
- DE OLIVEIRA, A.R.M., SZCZERBOWSKI, D. Quinina: 470 anos de história, controvérsias e desenvolvimento. **Química Nova**, v.32, n.5, 2009.
- DE UGAZ, O. L. Productos naturales: importancia y perspectivas. **Revista de Química**, v.1, n.1 p. 49-54, 2017.
- DENARO, M., SMERIGLIO, A., BARRECA, D., DE FRANCESCO, C., OCCHIUTO, C., MILANO, G., TROMBETTA, D. Antiviral activity of plants and their isolated bioactive compounds: An update. **Phytotherapy Research**, n.34, v.4, p. 742-768, 2020.
- DEREUDDRE, J., FABRE, J., BASSAGLIA, C. Resistance to freezing in liquid nitrogen of carnation (*Dianthus caryophyllus* L. var Eolo) apical and axillary shoot tips excised from different aged *in vitro* plantlets. **Plant Cell Reports**, v. 7, n. 3, p. 170-173, 1990.
- DHUNGANA, S. A., KUNITAKE, H., NIINO, T., YAMAMOTO, S. I., FUKUI, K., TANAKA, D.; MATSUMOTO, T. Cryopreservation of blueberry shoot tips derived from *in vitro* and current shoots using D cryo-plate technique. **Plant Biotechnology**, v. 34, n. 1, p. 1-5,, 2017.
- DIALLO, D., GUISSOU, I. P., HAÏDARA, M., TALL, C., KASIDO, O. M. J. Drissa. Recherche sur la médecine traditionnelle africaine: hypertension. **The African Health Monitor**, 2010.
- DIXIT-SHARMA, S., AHUJA-GHOSH, S., MANDAL, B. B., SRIVASTAVA, P. S. Metabolic stability of plants regenerated from cryopreserved shoot tips of *Dioscorea deltoidei*-an endangered medicinal plant. **Scientia horticulturae**, v. 105, n. 4, p. 513-517, 2005.
- DOS SANTOS, C. H. C., DE CARVALHO, M. G., FRANKE, K., WESSJOHANN, L. Dammarane-type triterpenoids from the stem of *Ziziphus glaziovii* Warm.(Rhamnaceae). **Phytochemistry**, v. 162, p. 250-259, 2019.
- DUFFY, J. E., LEFCHECK, J. S., STUART-SMITH, R. D., NAVARRETE, S. A., EDGAR, G. J. Biodiversity enhances reef fish biomass and resistance to climate change. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 22, p. 6230-6235, 2016.
- DUMET, D., ENGELMANN, F., CHABRILLANGE, N., DUSSERT, S., DUVAL, Y. Effect of various sugars and polyols on the tolerance to desiccation and freezing of oil palm polyembryonic cultures. **Seed Science Research**, v. 4, n. 3, p. 307-313, 1994.
- ECHEVERRIGARAY, S., MOSSI, A. J., MUNARI, F. Micropropagation of raisin tree (*Hovenia dulcis* Thunb.) through axillary bud culture. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, v. 7, n. 2, p. 99-102, 1998.
- ENGELMANN, F. Cryopreservation of clonal crops: a review of key parameters. In: **II International Symposium on Plant Cryopreservation** 1039. p. 31-39, 2013.
- ENGELMANN, F. *In vitro* conservation of tropical plant germplasm - a review. **Euphytica**, v. 57, n. 3, p. 227-243, 1991.
- ENGELMANN, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 47, n. 1, p. 5-16, 2011.

- ENGELMANN, F., TAKAGI, H. **Cryopreservation of tropical plant germplasm: current research progress and applications.** 2000.
- EOM, S. H., KANG, W. H., SHIN, D. Y., HEO, K., CHOI, W. C., LEE, H. Y., YU, C. Y. Callus formation and multiple shoot induction of *Hovenia dulcis* Thunb. **Korean Journal of Plant Resources**, v. 15, n. 3, p. 237-242, 2002.
- ESPINOSA-LEAL, C. A., PUENTE-GARZA, C. A., GARCÍA-LARA, S. *In vitro* plant tissue culture: means for production of biological active compounds. **Planta**, v. 248, n.1, p.1-18, 2018.
- EVERT, Ray F. **Esau's plant anatomy: meristems, cells, and tissues of the plant body: their structure, function, and development.** John Wiley & Sons, 2006.
- FAZAL, H., ABBASI, B. H., AHMAD, N. Optimization of adventitious root culture for production of biomass and secondary metabolites in *Prunella vulgaris* L. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 174, n. 6, p. 2086-2095, 2014.
- FUNNEKOTTER, B., BUNN, E., MANCERA, R. L. Cryo-mesh: a simple alternative cryopreservation protocol. **CryoLetters**, v. 38, n. 2, p. 155-159, 2017.
- GADELHA, A. P. R., VIDAL, F., CASTRO, T. C., LOPES, C. S., ALBARELLO, N., COELHO, M. G. P., FIGUEIREDO, S. F. L., MONTEIRO-LEAL, L. H. **Revista de Parasitologia**, n. 97, p. 399-407, 2005.
- GANDAGULE, U. B., DURAISWAMY, B., ZALKE, A., BHURAT, M. R., NAGDEV, S. A. Evaluation of *In Vitro* Antioxidant Activity of Leaves, Stem and Stem Bark Extracts of *Ziziphus xylopyrus* (Retz) Willd. **Inventi Rapid: Ethnopharmacology**, v. 1, p. 14, 2019.
- GANDHI, S.G.; MAHAJAN, V.; BEDI, Y.S. Changing trends in biotechnology of secondary metabolism in medicinal and aromatic plants. **Planta**. v. 241, n. 2, p. 303-317, 2015.
- GAUTIER, F., LABEL, P., ELIÁŠOVÁ, K., LEPLÉ, J. C., MOTYKA, V., BOIZOT, N., LESAGE-DESCAUSES, M. C. Cytological, biochemical and molecular events of the embryogenic state in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* [Mirb.]). **Frontiers in Plant Science**, v. 10, 118, 2019.
- GEORGE, E. F. Plant propagation by tissue culture. Part 1: **The Technology**. Exegetics limited, 2008.
- GEORGIEVA, E., PETROVA, D., YORDANOVA, Z., KAPCHINA-TOTEVA, V., CELLAROVA, E., CHANEVA, G. Influence of cryopreservation on the antioxidative activity of *in vitro* cultivated *Hypericum* species. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 28, n. 5, p. 863-870, 2014.
- GERY, C. et al. Natural variation in the freezing tolerance of *Arabidopsis thaliana*: Effects of RNAi-induced CBF depletion and QTL localisation vary among accessions. **Plant Science**, v. 180, p.12-23, 2011.
- GHORBANPOUR, M., VARMA, A. **Medicinal Plants and Environmental Challenges.** Springer, 2017.
- GÖÇMEN, C., SEÇILMIS, C., KUMCU, E. K., ERTUG, P. U., ÖNDER, S., DIKMEN, A., BAYSAL, F. Effects of vitamin E and sodium selenate on neurogenic and endothelialrelaxation

of corpus cavernosum in the diabetic mouse. **European Journal of Pharmacology** v. 398 p. 93-98, 2000.

GONZALEZ-ARNAO, M. T., MARTINEZ-MONTERO, M. E., CRUZ-CRUZ, C. A., ENGELMANN, F. Advances in Cryogenic Techniques for the Long-Term Preservation of Plant Biodiversity. In: AHUJA, M. R.; RAMAWAT, K.G. (eds.). **Biotechnology and Biodiversity, Sustainable Development and Biodiversity 4**. Springer International Publishing, Switzerland, 2014

GONZALEZ-ARNAO, M. T., PANTA, A., ROCA, W. M., ESCOBAR, R. H., ENGELMANN, F. 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.

GONZÁLEZ-ARNAO, M., ENGELMANN, F. Crioconservación de plantas en América Latina y el Caribe. IICA, **San José (Costa Rica)**, 2013.

GONZÁLEZ-TEUBER, M., HEIL, M. Nectar chemistry is tailored for both attraction of mutualists and protection from exploiters. **Plant signaling & behavior**, v. 4, n. 9, p. 809-813, 2009.

GUERRA, M. P., NODARI, R. O. Apostila de Biotecnologia – LFDGV/CCA/UFSC. Florianópolis: Edição da Steinmacher, 41p. 2006.

HAZUBSKA-PRZYBYŁ, T., DERING, M. Somaclonal variation during *Picea abies* and *P. omorika* somatic embryogenesis and cryopreservation. **Acta Biologica Cracoviensia s. Botanica**, v. 59, n. 1, p. 93-103, 2017.

HENRIQUES, A. T.; LIMBERGER, R. P.; KERBER, V. A.; MORENO, P.R.H. Alcaloides: generalidades e aspectos básicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Eds.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS, 5 ed., 2010.

HOU, X., ZHANG, J., AHMAD, H., ZHANG, H., XU, Z., WANG, T. Evaluation of antioxidant activities of ampelopsin and its protective effect in lipopolysaccharide-induced oxidative stress piglets. **PLoS one**, v. 9, n. 9, e108314, 2014.

HIRAI, D., SAKAI, A. Simplified cryopreservation of sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] by optimizing conditions for osmoprotection. **Plant cell reports**, v. 21, n. 10, p. 961-966, 2003.

HITMI, A., SALLANON, H., BARTHOMEUF, C. Cryopreservation of *Chrysanthemum cinerariaefolium* Vis. cells and its impact on their pyrethrin biosynthesis ability. **Plant cell reports**, v. 17, n. 1, p. 60-64, 1997.

HUSSAIN, A., QARSHI, I.A., NAZIR, H., ULLAH, I. Plant Tissue Culture: Current Status and Opportunities. In: LEVA, A., RINALDI, L.M.R. Recent advances in plant in vitro culture. 1st edition. InTech, **Croatia**, 210p. 2012.

HUSSEIN, M. B., HAMAD, M. N. M. Phytochemical Screening, Antimicrobial and Antioxidant Activity of *Ziziphus Spina-Christi* (L.)(Rhamnaceae) Leaves and Bark extracts. **MAR Microbiology**. 2021.

HYUN, T. K., EOM, S. H., YU, C. Y., ROITSCH, T. *Hovenia dulcis* - an Asian traditional herb. **Planta Medica**, v. 76, n. 10, p. 943–949, 2010.

- 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, p. 299-307, 2019.
- IBRAHIM, S., NORMAH, M. N. The survival of *in vitro* shoot tips of *Garcinia mangostana* L. after cryopreservation by vitrification. **Plant Growth Regulation**, v. 70, n. 3, p. 237-246, 2013.
- IRMISCH, S., RUEBSAM, H., JANCSIK, S., SAINT YUEN, M. M., MADILAO, L. L., BOHLMANN, J. Flavonol biosynthesis genes and their use in engineering the plant antidiabetic metabolite montbretin A. **Plant Physiology**, v. 180, n. 3, p. 1277-1290, 2019.
- ISMAIL, F. M.D. Nature's Armamentarium against Malaria: Antimalarials and Their Semisynthetic Derivatives. Nutraceuticals and Natural Product Derivatives: **Disease Prevention & Drug Discovery**, p. 333-373, 2019.
- JAMSHIDI-KIA, F., LORIGOOINI, Z., AMINI-KHOEI, H. Medicinal plants: Past history and future perspective. **Journal of herbmed pharmacology**, v. 7, n. 1, 2018.
- JAIN, K. J., PAULSON, R. J., Oocyte cryopreservation. **Fertility and Sterility**, v. 86, n. 3, p. 1037-1046, 2006.
- JEONG M. J., SONG, H. J., PARK D. J., MIN J. Y., JO, J. S., KIM, B. M., KIM, H. G., KIM, Y. D., KIM R. M., KARIGAR C. S., CHOI, M. S. High frequency plant regeneration following abnormal shoot organogenesis in the medicinal tree *Hovenia dulcis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, n. 98, p. 59-65, 2009.
- JIMENEZ-GARCIA, S. N., VAZQUEZ-CRUZ, M. A., GUEVARA-GONZALEZ, R. G., TORRES-PACHECO, I., CRUZ-HERNANDEZ, A., FEREGRINO-PEREZ, A. A. Current Approaches for Enhanced Expression of Secondary Metabolites as Bioactive Compounds in Plants for Agronomic and Human Health Purposes - a Review. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v.63, n.2, p.67-78, 2013.
- JITSUYAMA, Y., SUZUKI, T., HARADA, T., FUJIKAWA, S. Sucrose incubation increases freezing tolerance of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) embryogenic cell suspensions. **CryoLetters**, v. 23, n. 2, p. 103-112, 2002.
- JOKIPII, S. M., RYYNÄNEN, L. A., KALLIO, P. T., ARONEN, T. S., HÄGMAN, H. A cryopreservation method maintaining the genetic fidelity of a model forest tree *Populus tremula* L. x *P. tremuloides* Michx. **Plant Science**, v. 166, p. 799-806, 2004.
- KALAISELVI, R., RAJASEKAR, M., GOMATHI, S. Cryopreservation of plant materials - a review. **International Journal of Chemical Studies** v. 5, n. 5, p. 560-564, 2017.
- KALITA, V., CHOUDHURY, H., KUMARIA, S., TANDON, P. Vitrification-based cryopreservation of shoot-tips of *Pinus kesiya* royle ex. gord. **CryoLetters**, v. 33, n. 1, p. 58-68, 2012.
- KANG, K. B., JUN, J. B., KIM, J. W., KIM, H. W., SUNG, S. H. Ceanothane-and lupine-type triterpene esters from the roots of *Hovenia dulcis* and their antiproliferative activity on HSC-T6 cells. **Phytochemistry**, v. 142, p. 60-67, 2017.

KAPOOR, S., SHARMA, A., BHARDWAJ, P., SOOD, H., SAXENA, S., CHAURASIA, O. P. Enhanced Production of Phenolic Compounds in Compact Callus Aggregate Suspension Cultures of *Rhodiola imbricata* Edgew. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, n. 187, p. 817–837, 2019.

KARTHA, K.K., LEUNG, N.L., MROGINSKI, L.A. *In vitro* growth responses and plant regeneration from cryopreserved meristems of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Zeitschrift für Pflanzen Physiologie**, v. 107, p. 133-140, 1982.

KIM, H. R., KIM, B. M., WON, J. Y., LEE, K. A., KO, H. M., KANG, Y. S., KIM, K. W. Quercetin, a Plant Polyphenol, Has Potential for the Prevention of Bone Destruction in Rheumatoid Arthritis. **Journal of Medicinal Food**, v. 22, n. 2, p. 152-161, 2019.

KOLLER, G. L., ALEXANDER III, J. H. The raisin tree - its use, hardiness and size. **Arnoldia**, v.39, p.7-15, 1979.

KOU, X., CHEN C. Pharmacological potential of ampelopsin in Rattan tea. **Food Science and Human**, v. 1, n. 1, p. 14-18, 2012.

KOVAČEVIĆ, N., GRUBIŠIĆ, D. *In vitro*. cultures of plants from the rhamnaceae: shoot propagation and anthraquinones production. **Pharmaceutical biology**, v. 43, n. 5, p. 420-424, 2005.

KREMER, D., KOSALEC, I., LOCATELLI, M., EPIFANO, F., GENOVESE, S., CARLUCCI, G., KONČIĆ, M. Z. Anthraquinone profiles, antioxidant and antimicrobial properties of *Frangula rupestris* (Scop.) Schur and *Frangula alnus* Mill. bark. **Food Chemistry**, v. 131, n. 4, p. 1174-1180, 2012.

KRISHNAN, P.N.; DECRUSE, S.W.; RADHA, R.K. Conservation of medicinal plants of Western Ghats, India and its sustainable utilization through *in vitro* technology. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 47, p. 110-122, 2011.

KULUS, D. Shoot tip cryopreservation of *Lamprocapnos spectabilis* (L.) Fukuhara using different approaches and evaluation of stability on the molecular, biochemical, and plant architecture levels. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 11, 3901, 2020.

KULUS, D., ZALEWSKA, M. Cryopreservation as a tool used in long-term storage of ornamental species-a review. **Scientia Horticulturae**, v. 168, p. 88-107, 2014.

KULUS, D., REWERS, M., SEROCKA, M., MIKUŁA, A. Cryopreservation by encapsulation-dehydration affects the vegetative growth of chrysanthemum but does not disturb its chimeric structure. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 138, n. 1, p. 153-166, 2019.

KUMAR, L., KAPOOR, N., TIWARI, A. Biotechnology to Restoration and Conservation. In: **Microbial Biotechnology Approaches to Monuments of Cultural Heritage**. Springer, Singapore. p. 151–175, 2020.

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, n. 3, p. 213-218, 2000.

- LAMBARDI, M., SHAARAWI, S. Importance of *in vitro* culture for developing cryopreservation strategies of woody plants. In: **IX International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding 1187**. p. 177-188, 2016.
- LARKIN, P., SCOWCROFT, W. R. Somaclonal variation—a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 60, p. 197-214, 1981.
- LE, T. C., KANG, K. Y., YANG, I., LEUTOU, A. S., KO, J., SON, Y. J., NAM, S. J. A new secondary metabolite from Korean traditional herb plant *Hovenia dulcis*. **Natural Product Communications**, v. 13, n. 4, 2018.
- LI, D., YUE, D., LIU, D., ZHANG, L., SONG, S. Phytochemical and chemotaxonomic study on *Ziziphus Jujuba* Mill.(Rhamnaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 91, 104058, 2020.
- LI, G., MIN, B.S., ZHENG, C., JOONGKU LEE, J., OH, S.R., AHN, K.S., LEE, H.K. Neuroprotective and Free Radical Scavenging Activities of Phenolic Compounds from *Hovenia dulcis*. **Archives of Pharmacal Research**. v. 28 n.7, p. 804-809, 2005.
- LI, H., LI, Q., LIU, Z., YANG, K., CHEN, Z., CHENG, Q., WU, L. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, v. 2017, 2017.
- LI, M. C., XIE, C. J., MENG, C. W., ZHANG, Y. Q., GAO, J. G., WANG, W. H., XU, Y. N. Chemical constituents from *Hovenia dulcis* Thunb. And their chemotaxonomic significance. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.94, 104214, 2021.
- LI, Z., JIANG, X., LU, Y., REN, R., ZHANG, Y., LIU, Y. Pollen cryopreservation of 6 modern rose cultivars. **Southwest China Journal of Agricultural Sciences**, v. 32, n. 6, p. 1376–1382, 2019.
- LIM, S. J., KIM, M., RANDY, A., NAM, E. J., NHO, C. W. Effects of *Hovenia dulcis* Thunb. extract and methyl vanillate on atopic dermatitis-like skin lesions and TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$ -induced chemokines production in HaCaT cells. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 68, n. 11, p. 1465–1479, 2016.
- LIU, Y., WANG, X., LIU, L. Analysis of genetic variation in surviving apple shoot following cryopreservation by vitrification. **Plant Science**, v.166, p. 677-685, 2004.
- MACHADO, H., N. T. J., PETERS, V. M., FONSECA, C. S., DE OLIVEIRA, T. T. Flavonóides e seu potencial terapêutico. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução (Descontinuado)**, v. 27, n. 1/2, 2008.
- MANDAL, B. B., DIXIT-SHARMA, S. Cryopreservation of in vitro shoot tips of *Dioscorea deltoidea* Wall., an endangered medicinal plant: effect of cryogenic procedure and storage duration. **CryoLetters**, v. 28, n. 6, p. 461–470, 2007.
- MARCO-MEDINA, A., CASAS, J. L. RAPD and phytochemical analysis of *Thymus moroderi* plantlets after cryopreservation. **CryoLetters**, v. 34 n. 2, p. 119-127, 2013.
- MARCO-MEDINA, A., CASAS, J. L., SWENNEN, R., PANIS, B. Cryopreservation of *Thymus moroderi* by droplet-vitrification. **CryoLetters**, v. 31, p. 14-23, 2010.



- MARTÍN, C., CERVERA, M. T., GONZÁLEZ-BENITO, M. E. Genetic stability analysis of chrysanthemum (*Chrysanthemum x morifolium* Ramat) after different stages of an encapsulation-dehydration cryopreservation protocol. **Journal of plant physiology**, v. 168, n. 2, p. 158-166, 2011.
- MARTINEZ-MONTERO, M. E., GONZÁLEZ-ARNAO, M. T., BORROTO-NORDELO, C., PUENTES-DIAZ, C., ENGELMANN, F. Cryopreservation of sugarcane embryogenic callus using a simplified freezing process. **CryoLetters**, v. 19, n. 3, p.171-176, 2020.
- MATSUMOTO, T. Cryopreservation of plant genetic resources: conventional and new methods. **Reviews in Agricultural Science**, v. 5, p. 13-20, 2017.
- MATSUMOTO, T., YAMAMOTO, S., FUKUI, K., RAFIQUE, T., ENGELMANN, F., NIINO, T. Cryopreservation of *Persimmon* shoot tips from dormant buds using the D cryo-plate technique. **The Horticulture Journal**, v. 84, n. 2, p.106-110, 2015.
- MATSUMOTO, T., SAKAI, A., TAKAHASHI, C., YAMADA, K. Cryopreservation of *in vitro* grown meristems of wasabi (*Wasabia japonica*) by encapsulation-vitrification method **CryoLetters**, v. 16, n. 4, p. 189 1995.
- MEDAN, D., SCHIRAREND, C. Rhamnaceae. In: **Flowering Plants**· Dicotyledons. Springer, Berlin, Heidelberg, p. 320-338, 2004.
- MENG, Y., SU, A., YUAN, S., ZHAO, H., TAN, S., HU, C., GUO, Y. Evaluation of Total Flavonoids, Myricetin, and Quercetin from *Hovenia dulcis* Thunb. As Inhibitors of  $\alpha$ -Amylase and  $\alpha$ -Glucosidase. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 71 n. 4, p. 444-449, 2016.
- MENON, A., FUNNEKOTTER, B., KACZMARCZYK, A., BUNN, E., TURNER, S., MANCERA, R. L. Cyopreservation of *Lomandra sonderi* (Asparagaceae) shoot tips using Droplet-Vitrification. **CryoLetters**, v. 33, n. 4, p. 259-270, 2012.
- MOHIUDDIN, A. K. Medicinal and Therapeutic values of *Sesbania grandiflora*. **Medicine**, v. 4, p. 18, 2019.
- MONDAL, A., MAITY, T. K., BISHAYEE, A. Analgesic and Anti-Inflammatory Activities of Quercetin-3-methoxy-4'-glucosyl-7-glucoside Isolated from Indian Medicinal Plant *Melothria heterophylla*. **Medicines**, v. 6, n. 2, p. 59, 2019.
- MONSALVE-BUSTAMANTE, Y. A., PUERTAS-MEJIA, M. A., MEJIA-GIRALDO, J. C. Comparison of the photoprotective effect between hydrolyzed and aglycones flavonoids as sunscreen: A systematic review. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 10, n. 1, p. 116-123, 2020.
- MURAKAMI, T., MIYAKOSHI, M., ARAHO, D., MIZUTANI, K., KAMBARA, T. Hepatoprotective activity of tocha, the stems and leaves of *Ampelopsis grossedentata*, and ampelopsin. **BioFactors** (Oxford, England), 21, 175-178, 2004.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F. A. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, v. 15, p. 473-497, 1962.
- NA, C., YOON, S. Y., KIM, J. B., NA, B., DONG, M., LEE, M., HONG, C. Y. Anti-fatigue Activity of *Hovenia dulcis* on a Swimming Mouse Model through the Inhibition of Stress

Hormone Expression and Antioxidation. **The American Journal of Chinese Medicine**, v. 41, n. 4, p. 945-955, 2013.

NARDINI, M., GARAGUSO, I. Characterization of bioactive compounds and antioxidant activity of fruit beers. **Food chemistry**, v. 305, 125437, 2020.

NICHOLSON, E., FULTON, E. A., BROOKS, T. M., BLANCHARD, R., LEADLEY, P., METZGER, J. P., BARNES, M. Scenarios and models to support global conservation targets. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 34, n. 1, p. 57-68, 2019.

NIINO, T., GUPTA, S., MEENA, D. P. S. Cryopreservation of shoot apices using V cryo-plate and D cryo-plate method. **Laboratory Manual for Eighth International Training Course**, p. 17, 2019.

NIINO, T., SAKAI, A. Cryopreservation of alginated coated *in vitro* grown shoot-tips of apple, pear and mulberry. **Plant Science**, v. 87, p. 199-206, 1992.

NISHIZAWA, S., SAKAI, A., AMANO, Y., MATSUZAWA, T. Cryopreservation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) embryogenic suspension cells and subsequent plant regeneration by vitrification. **Plant Science**, v. 91, p. 67-73, 1993.

NIU, Y., LUO, Z., ZHANG, Y., ZHANG, Q. Cryopreservation of *in vitro* grown shoot tips of *Diospyros kaki* Thunb. using different methods. **CryoLetters**, v. 33, p. 69-74, 2012.

NOOR, N. M., AIZAT, W. M., HUSSIN, K., ROHANI, E. R. Seed characteristics and germination properties of four Garcinia (Clusiaceae) fruit species. **Fruits**, v. 71, n. 4, p. 199-207, 2016.

NOOR, N. M., SULONG, N., REED, B. M. Cryopreservation of shoot tips of recalcitrant and tropical species: Advances and strategies. **Cryobiology**, 2019.

NORMAH, M. N., CHIN, H. F., HOR, Y. L. Desiccation and cryopreservation of embryonic axes of *Hevea brasiliensis* Muell.- Arg. **Pertanika**, v. 9, n. 3, p. 299-303, 1986.

NGO, Q. M. T., HA, M. T., VU, N. K., KIM, J. A., WOO, M. H., MIN, B. S. Constituents from the pseudofruits of *Hovenia dulcis* and their chemotaxonomic significance. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 94, 104221. 2021.

NGUYEN, T. T., TAKAGI, H., SAKAI, A. Cryopreservation of *in vitro*-grown apical meristems of some vegetatively propagated tropical monocots by vitrification. In: Cryopreservation of tropical plant germplasm: current research progress and application. Proceedings of an international workshop, Tsukuba, Japan, October, 1998. **International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI)**, 2000. p. 227-232.

O'BRIEN, C., HITI-BANDARALAGE, J., FOLGADO, R., LAHMEYER, S., HAYWARD, A., FOLSOM, J., MITTER, N. A method to increase regrowth of vitrified shoot tips of avocado (*Persea americana* Mill.): First critical step in developing a cryopreservation protocol. **Scientia Horticulturae**, v. 266, 109305, 2020.

OGAWA, Y., SUZUKI, H., SAKURAI, N., AOKI, K., SAITO, K., SHIBATA, D. Cryopreservation and metabolic profiling analysis of Arabidopsis T87 suspension-cultured cells. **CryoLetters**, v.29 n.5, p. 427-436. 2008

OH, K. N., KIM, Y., CHOI, E. J., LEE, H., KIM, J. A. H., OH, D. R., CHOI, C. Y. Laxative Activity of the Hot-Water Extract Mixture of *Hovenia dulcis* Thunb. and *Phyllostachys pubescens* Mazel in Chronic Constipation Model SD Rats. **Journal Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n.5, p. 649-661, 2020.

ONU, The Convention on Biological Diversity. Disponível em: <[https:// https://www.cbd.int/](https://www.cbd.int/)>. Acesso em: 09 de jun. de 2020.

OSHIMA, Y., NAMAOKA, K., KAMIJOU, A., MATSUOKA, S., NAKANO, M., TERAOKA, K., OHIZUMI, Y. Powerful hepatoprotective and hepatotoxic plant oligostilbenes, isolated from the oriental medicinal plant *Vitis coignetiae* (Vitaceae). **Experientia**, v. 51, n. 1, p. 63-66, 1995.

PAEK, K. Y., CHAKRABARTY D., HAHN E. J. Application of bioreactor systems for large scale production of horticultural and medicinal plants. In: Hvoslef-Eide A.K., Preil W. (eds) *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*. Springer, **Dordrecht**, p. 95-116, 2005.

PANIS, B. Sixty years of plant cryopreservation: from freezing hardy mulberry twigs to establishing reference crop collections for future generations. In: **III International Symposium on Plant Cryopreservation** 1234. p. 1-8. 2018.

PANIS, B., PIETTE, B., SWENNEN, R. Droplet Vitrification of apical meristems: a cryopreservation protocol applicable to all Musaceae. **Plant science**, v. 168, n. 1, p. 45-55, 2005.

PÁQUES, M., MONOD, V., POISSONNIER, M., DEREUDRE, J. Cryopreservation of *eucalyptus* sp. shoot tips by the encapsulation–dehydration procedure. In: Towill LE, Bajaj YPS (eds) **Biotechnology in Agriculture and Forestry**, Springer, Berlin, v. 50. p.234-245, 2002.

PARASHAR, S., UPLANCHIWAR, V., GAUTAM, R. K., GOYAL, S. *In vitro* antioxidant and *in vivo* hepatoprotective activity of ethanolic extract of *Ziziphus rugosa* Lam. **Leaves**. v. 56, n.7, p. 69-75, 2019.

PARK, D. J., KANG, Y. M., JUNG, H. N., MIN, J. Y., KIM, Y. D., KARIGAR, C. S., CHOI, M. S. Rapid Micropropagation of *Hovenia dulcis* Thunb. Through *in vitro* Stem Nodal Cultures. **Journal of Korean Society of Forest Science**, v. 95, n. 2, p. 155–159, 2006.

PARK, G. B., JEONG, J. Y., KIM, D. Ampelopsin-induced reactive oxygen species enhance the apoptosis of colon cancer cells by activating endoplasmic reticulum stress-mediated AMPK/MAPK/XAF1 signaling. **Oncology Letters**, v. 14, p. 7947-7956, 2017.

PARK, J. S., KIM, I. S., REHMAN, S. U., NA, C. S., YOO, H. H. HPLC determination of bioactive flavonoids in *Hovenia dulcis* fruit extracts. **Journal of Chromatographic Science**, v.54, n. 2, p. 130-135, 2015.

PARK, K., YOON, H. J., IMM, J. Y., GO, G. W. *Hovenia dulcis* Extract Attenuates High-Fat Diet-Induced Hepatic Lipid Accumulation and Hypertriglyceridemia in C57BL/6 Mice. **Journal of Medicinal Food**, v. 22, n. 1, p. 74-80, 2019.

PARVIN, K., HASANUZZAMAN, M., BHUYAN, M. H. M., MOHSIN, S. M., FUJITA, M. Quercetin mediated salt tolerance in tomato through the enhancement of plant antioxidant defense and glyoxalase systems. **Plants**, v. 8, n. 8, 247, 2019.

PAVIA, D. L., LAMPMAN, G., M. KRIZ, G., S. VYVYAN, J., R. Espectroscopia no ultravioleta. In: PAVIA, D. L (eds). Introdução à espectroscopia. **Cengage learning**. p. 365–398, 2012.

PETTINELLI, J., DE OLIVEIRA SOARES, B., CANTELMO, L., DE OLIVEIRA GARCIA, R., MANSUR, E., ENGELMANN, F., GAGLIARDI, R. F. Cryopreservation of somatic embryos from *Petiveria alliacea* L. by different techniques based on vitrification. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 53, n. 4, p. 339–345, 2017.

PHILLIPS, C. G., GARDA, M. Plant tissue culture media and practices: an overview. **In Vitro Cellular & Developmental Biology**, n. 55, p. 242–257, 2019.

PINENT, M., CASTELL, A., BAIGES, I., MONTAGUT, G., AROLA, L., ARDÉVOL, A. Bioactivity of Flavonoids on Insulin-Secreting Cells. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, n.4, v.7, 2008.

POSTMAN, J., HUMMER, K., STOVER, E., KRUEGER, R., FORSLINE, P., GRAUKE, L. J., IRISH, B. Fruit and nut genebanks in the US National Plant Germplasm System. **HortScience**, v. 41, n. 5, p. 1188-1194, 2006.

PRAKASH, O., USMANI, S., SINGH, R., SINGH, N., GUPTA, A., VED, A. A panoramic view on phytochemical, nutritional, and therapeutic attributes of *Ziziphus mauritiana* Lam.: A comprehensive review. **Phytotherapy Research**, v. 35, n. 1, p. 63-77, 2021.

PRUDENTE, D. O., PAIVA, R., PAIVA, P. D. O., SILVA, L. C. Cryopreservation of shoot tips excised from zygotic embryos of *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze. In: XXIX **International Horticultural Congress on Horticulture: Sustaining Lives, Livelihoods and Landscapes (IHC2014)**: 1113. p. 257-264. 2014.

QI, S., KOU, X., LV, J., QI, Z., YAN, L. Ampelopsin induces apoptosis in HepG2 human hepatoma cell line through extrinsic and intrinsic pathways: Involvement of P38 and ERK. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 40, p. 847-854, 2015.

QI, S., XIN, Y., GUO, Y., DIAO, Y., KOU, X. Ampelopsin reduces endotoxin inflammation via repressing ROS-mediated activation of PI3K/Akt/NF $\kappa$ B signaling pathways. **International Immunopharmacology**, v. 12, p. 278-287, 2012.

RAFIQUE, T., YAMAMOTO, S. I., FUKUI, K., MAHMOOD, Z., NIINO, T. Cryopreservation of sugarcane using the V cryo-plate technique. **CryoLetters**, v. 36, n. 1, p. 51-59, 2015.

RAFIQUE, T., YAMAMOTO, S. I., FUKUI, K., TANAKA, D., ARIZAGA, M. V., ABBAS, M.; NIINO, T. Cryopreservation of shoot-tips from different sugarcane varieties using D cryo-plate technique. **Pakistan Journal of Agricultural Sciences**, v. 53, n. 1, 2016.

RANTALA, S., KASEVA, J., KARHU, S., VETELÄINEN, M., UOSUKAINEN, M., HÄGGMAN, H. Cryopreservation of *Ribes nigrum* (L.) dormant buds: recovery via *in vitro* culture to the field. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 138, n. 1, p. 109–119, 2019.

RATHORE, J. S., RATHORE, V., SHEKHAWAT, N. S., SINGH, R. P., LILER, G., PHULWARIA, M., DAGLA, H. R. Micropropagation of woody plants. Dordrecht, **The Netherlands: Kluwer Academic Publishers**. 2004.

- RAVEN, P. H., AXELROD, D. I. Angiosperm biogeography and past continental movements. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 61, n. 3, p. 539-673, 1974.
- REN-BO, A., PARK, E.J., JEONG, G.S., SOHN, D.H., KIM, Y.C. Cytoprotective Constituent of *Hovenia* Lignum on Both Hep G2 Cells and Rat Primary Hepatocytes. **Archives of Phamacal Research**, v. 30, n. 6, p. 674-677, 2007.
- RIBEIRO, I. G. Produção *in vitro*, análise fitoquímica e avaliação da atividade antineoplásica de metabólitos de *Hovenia dulcis* Thunb. (Rhamnaceae) obtidos por diferentes estratégias biotecnológicas. **Tese de Doutorado**, Programa de Pós-Graduação em Biociências nucleares, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.
- RIBEIRO, I. G., GAYER, C. R. M., DE CASTRO, T. C., COELHO, M. G. P., ALBARELLO, N. Compact callus cultures and evaluation of the antioxidant activity of *Hovenia dulcis* Thunb.(Rhamnaceae) under *in vivo* and *in vitro* culture conditions. **Journal of Medicinal Plant Research**, v. 9, p. 8-15, 2015.
- RIBEIRO, I. G., CASTRO, T. C. D., COELHO, M. G. P., ALBARELLO, N. Effects of different factors on friable callus induction and establishment of cell suspension culture of *Hovenia dulcis* (Rhamnaceae). **Rodriguésia**, v. 72, 2021.
- ROBERTS, M., F. (Ed.). **Alkaloids: biochemistry, ecology, and medicinal applications**. Springer Science & Business Media, 2013.
- ROCCHETTI, G., MIRAS-MORENO, M. B., ZENGIN, G., SENKARDES, I., SADEER, N. B., MAHOMOODALLY, M. F., LUCINI, L. UHPLC-QTOF-MS phytochemical profiling and *in vitro* biological properties of *Rhamnus petiolaris* (Rhamnaceae). **Industrial Crops and Products**, v. 142, 111856, 2019.
- ROUTA, G.R., SAMANTARAY, S., DAS, P. *In vitro* manipulation and propagation of medicinal plants. **Biotechnology Advances**, v. 18, n. 2, p. 91-120, 2000.
- RYYNÄNEN, L. Survival and regeneration of dormant silver birch buds stored at superlow temperatures. **The Canadian Journal of Forest Research**, v. 26, p. 617–623, 1996.
- SADAT-HOSSEINI, M., VAHDATI, K., LESLIE, C. A. Germination of Persian Walnut Somatic Embryos and Evaluation of their Genetic Stability by ISSR Fingerprinting and Flow Cytometry. **HortScience**, v. 54, n. 9, p. 1576-1580, 2019.
- SAJINI, K. K., KARUN, A., KUMARAN, P. M. Cryopreservation of coconut (*Cocos nucifera* L.) zygotic embryos after pre-growth desiccation. **Journal of Plantation Crops**, v. 34, n. 3, p. 576, 2006.
- SAKAI, A. Development of cryopreservation techniques. In: ENGELMANN, F.; TAKAGI, H. (eds). Cryopreservation of tropical germplasm: **Current research progress and applications**. Japan, p.1-7, 2000.
- SAKAI, A., ENGELMANN, F. Vitrification, encapsulation-vitrification and dropletvitrification: a review. **CryoLetters**, v. 28, n. 3, p. 151-172, 2007.
- SAKAI, A., HIRAI, D., NIINO, T. Development of PVS-Based Vitrification Protocols. In: REED, B. M. (Ed.) **Plant Cryopreservation – A Practical Guide**. New York, USA: Springer. p. 33-57. 2008.

- 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, p. 30-33, 1990.
- SALMA, M., FKI, L., ENGELMANN-SYLVESTRE, I., NIINO, T., ENGELMANN, F. Comparison of droplet-vitrification and D-cryoplate for cryopreservation of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) polyembryonic masses. **Scientia horticulturae**, v. 179, p. 91-97, 2014.
- SANAYAIMA, R. K., KAUR, A., AGRAWAL, A., BABBAR, S. B. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of *Crateva nurvala* Buch. Ham, an important medicinal tree. **CryoLetters**, v. 27, n. 6, p. 375-386, 2006.
- SANG, J. K., SOO, N. C., BANG, E. J. Effect of *Hovenia dulcis* Thunb Extract on the Hyperglycemic Mice Induced with Streptozotocin. **Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition**, v. 34, n. 5, p. 632-637, 2005.
- SANT, R., PANIS, B., TAYLOR, M., TYAGI, A. Cryopreservation of shoot-tips by droplet vitrification applicable to all taro (*Colocasia esculenta* var. *esculenta*) accessions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 92, n. 1, p. 107-111, 2008.
- SFERRAZZA, G., BRUSOTTI, G., ZONFRILLO, M., TEMPORINI, C., TENGATTINI, S., BONONI, M., PIERIMARCHI, P. *Hovenia dulcis* Thunberg: Phytochemistry, Pharmacology, Toxicology and Regulatory Framework for Its Use in the European Union. **Molecules**, v. 26, n. 4, p. 903, 2021.
- SHAHBAZI, S., GHAMARI, Z. A., SEFIDKON, F., JAFARI, A. A., ABDOSSEI, V. Effects of Cryopreservation on the phytochemical stability of *Satureja sahendica* essential oil. **Journal of developmental biology**, v. 11 n. 4, p. 9-16, 2019.
- SHAHRAJABIAN, M. H., KHOSHKHARAM, M., ZANDI, P., SUN, W., CHENG, Q. Jujube, a super-fruit in traditional Chinese medicine, heading for modern pharmacological science. **Journal of Medicinal Plants**, v. 7, n. 4, p. 173-178, 2019.
- SHARMA, P., MANCHANDA, R., GOSWAMI, R., CHAWLA, S. Biodiversity and Therapeutic Potential of Medicinal Plants. In: **Environmental Concerns and Sustainable Development**. Springer, Singapore, p. 27-44, 2020.
- SHIRASAWA, Y. Common trees of Japan. Tokyo: **Kohdansha**. Ed.397 p.221,292,293. 1983.
- SILVERSTEIN, Robert M.; BASSLER, G. Clayton. Spectrometric identification of organic compounds. **Journal of Chemical Education**, v. 39, n. 11, p. 546, 2006.
- SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E. P., DE MELLO, J. C. P., MENTZ, L. A., PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Artmed Editora. 2016.
- SIMÕES, C.M.O., SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E. P., GOSMANN, G., MELLO, J. C. P., MENTZ, L. A., PETROVICK, P. R. (Eds.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS, 5 ed., 2010.
- SINGH, B., SHARMA, R.A. Plant terpenes: defense responses, phylogenetic analysis, regulation and clinical applications. **3 Biotech**, v. 5, n. 2, p. 129-151, 2015.

- SINGH, N. R., RATH, S. K., BEHERA, S., NAIK, S. K. *In Vitro* Secondary Metabolite Production Through Fungal Elicitation: An Approach for Sustainability. In: **Fungal Nanobionics: Principles and Applications**. Springer, Singapore. p. 215–242. 2018.
- SOLLIMAN, M. E. D., AL-KHATEEB, A. A., MOHASSEB, H. A. A., ALDAEJ, M., AL-KHATEEB, S. A. Towards development of new technique for cryopreservation of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) *In vitro* grown cultures. **Fresenius Environmental Bulletin**, v. 28, n. 8, p. 6256-6263, 2019.
- SOLLOZO-DUPONT, M., I., CAMARENA, E. E.; LÓPEZ-RUBALCAVA, C. Medicina tradicional: estudios preclínicos de plantas con propiedades ansiolíticas. **El Residente**, v. 6, n. 2, p. 78–84, 2011.
- STILLNER, F.J., AMARAL, H.R.B., PEDROSO, O., TREVISAN, R. Estudo sobre a madeira da uva-do-japão (*Hovenia dulcis* Thunb.). **Roessléria**, v. 5, n. 2, p. 361-370, 1983.
- SUN-HEE, P., EUN-YOUNG, C. Antimutagenic and Cytotoxic Effects of *Hovenia dulcis* Thumb Leaves Extracts. **Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition**, v.36 n. 11, p. 1371–1376, 2007.
- SUNIL, C., XU, B. An insight into the health-promoting effects of taxifolin (dihydroquercetin). **Phytochemistry**, v. 166, 112066, 2019.
- SURH, Y.J., KIM, H.J. Neurotoxic effects of tetrahydroisoquinolines and underlying mechanisms. **Experimental Neurobiology**, v. 19, n. 2, p. 63–70, 2010.
- SKYBA, M., et al. Physiological, biochemical and molecular characteristics of cryopreserved *Hypericum perforatum* L. shoot tips. **Cryoletters**, v. 31, p. 249–260, 2010.
- TAKAI, M., OGIHARA, Y., SHIBATA, S. New peptide alkaloids from *Hovenia dulcis* and *H. tomentella*. **Phytochemistry**, v. 12, n. 12, p. 2985–2986, 1973.
- TANAKA, D., ISHIZAKI, K., KOHCHI, T., YAMATO, K. T. Cryopreservation of Gemmae from the Liverwort *Marchantia polymorpha* L. **Plant and Cell Physiology**, v. 57, n. 2, p. 300–306, 2015.
- TERMIGNONI, R.R. Cultura de tecidos vegetais. **Porto Alegre**: Editora da UFRGS, 182 p., 2005.
- THAKUR, CHARU., PRASAD, BHAIKAV. Antiinflammatory Activity of Stem Bark of *Rhamnus purpureus*. **International Journal of Advance Microbiology Health**. v. 3, n. 1, p. 21–28, 2019.
- THAMMASIRI, K. Cryopreservation of embryonic axes of jackfruit by vitrification. In: **24 Congress on Science and Technology of Thailand**, Bangkok, Thailand, 1999.
- THORPE, T.A. History of Plant Cell Culture. In: SMITH, R.H. **Plant Tissue Culture**. Techniques and Experiments. Academic Press, Third Edition. p.188, 2012.
- TIENG, F. Y. F., LATIFAH, S. Y., HASHIM, M., FARIESHA, N., KHAZA'AI, H., AHMAT, N., WIBOWO, A. Ampelopsin E Reduces the Invasiveness of the Triple Negative Breast Cancer Cell Line, MDA-MB-231. **Molecules**, v. 24, n. 14, 2619, 2019.

- TOLDI, O., TUBA, Z., SCOTT, P. Vegetative desiccation tolerance: is it a goldmine for bioengineering crops? **Plant Science**, v. 176, n. 2, p. 187–199, 2009.
- TONHI, E., COLLINS, K. E., JARDIM, I. C., COLLINS, C. H. Fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE–FR) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados. **Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 616–623, 2002.
- TOUCHELL, D. H., DIXON, K. W., TAN, B. Cryopreservation of shoot–tips of *Grevillea scapigera* (Proteaceae): a rare and endangered plant from Western Australia. **Australian Journal of Botany**, v. 40, n. 3, p. 305–310, 1992.
- TOUCHELL, D., TURNER, S. R., SENARATNA, T., BUNN, E., DIXON, K. W. Cryopreservation of Australian species - the role of plant growth regulators. In: **Cryopreservation of plant germplasm II**. Springer, Berlin, Heidelberg. p. 373-390. 2002.
- TOWILL, L. E. Cryopreservation of plant germplasm: introduction and some observations. In: **Cryopreservation of Plant Germplasm II**. Springer, Berlin, Heidelberg. p. 3–21. 2002.
- TOWILL, L. E. Improved survival after cryogenic exposure of shoot–tips derived from in vitro plantlet cultures of potato. **Cryobiology**, v. 20, p. 567–573, 1983.
- TROPICOS, disponível em:  
<[www.tropicos.org/NameSearch.aspx?name=Hovenia&commonname=](http://www.tropicos.org/NameSearch.aspx?name=Hovenia&commonname=)> acessado em: 01/03/2022.
- TURNER, S., SENARATNA, T., TOUCHELL, D., BUNN, E., DIXON, K., TAN, B. Stereochemical arrangement of hydroxyl groups in sugar and polyalcohol molecules as an important factor in effective cryopreservation. **Plant Science**, v. 160, n. 3, p. 489-497, 2001.
- UCHENDU, E.E. et al. Vitamins C and E improve regrowth and reduce lipid peroxidation of blackberry shoot tips following cryopreservation. **Plant Cell Reports**, v. 29, p. 25-35, 2010.
- UNDP Human development. In: United Nations Development Programme, Uganda Human Development Report-**Rediscovering Agriculture for Human Development**, p 38, 2007.
- URAGAMI, A., SAKAI, A., NAGAI, M., TAKAHASHI, T. Cryopreservation by vitrification of cultured cells and somatic embryos from mesophyll tissue of asparagus. In: **VII International Asparagus Symposium 271**, p. 109-116, 1989.
- VANISREE, M., LEE, C., LO, S., NALAWADE S. M., LIN, C. Y., TSAY, H. Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**. v.45, p. 1-22, 2004.
- VENTER, O., MAGRACH, A., OUTRAM, N., KLEIN, C. J., POSSINGHAM, H. P., DI MARCO, M., WATSON, J. E. Bias in protected-area location and its effects on long-term aspirations of biodiversity conventions. **Conservation Biology**, v. 32, n. 1, p. 127-134, 2018.
- VETTORAZZI, R. G., CARVALHO, V. S., TEIXEIRA, M. C., CAMPOSTRINI, E., DA CUNHA, M., DE MATOS, E. M., VICCINI, L. F. Cryopreservation of immature and mature seeds of Brazilian orchids of the genus *Cattleya*. **Scientia Horticulturae**, v. 256, 108603, 2019.
- VIANNA, M. G., GARCIA, R. O., MANSUR, E., ENGELMANN, F., PACHECO, G. Oxidative stress during the cryopreservation of *Passiflora suberosa* L. shoot tips using the V–Cryo–plate



technique: determination of the critical stages of the protocol. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 139, n. 2, p. 369-379, 2019.

VIDAL, R., SILVA, N. C. D. A., OGLIARI, J. B. Old tools as new support for on farm conservation of different types of maize. **Scientia Agricola**, v.77, n.1, 2020.

VILARDO, A. F. R. M. Estudos de criopreservação, análise fitoquímica e avaliação da estabilidade genética de *Cleome spinosa* Jacq. (Cleomaceae). **Tese de doutorado**, Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

VILARDO, A. F. R. M., MENDONÇA, T. F., ENGELMANN, F., CORDEIRO, L. S., ALBARELLO, N., SIMÕES-GURGEL, C. Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of the medicinal species *Cleome spinosa* (Cleomaceae) applying vitrification-based techniques. **CryoLetters**, v. 40, n. 4, p. 237-246, 2019.

VOLK, G. M., HARRIS, J. L., ROTINDO, K. E. Survival of mint shoot tips after exposure to cryoprotectant solution components. **Cryobiology**, v. 52, n. 2, p. 305-308, 2006.

VUJOVIĆ, T., CHATELET, P., RUŽIĆ, Đ., ENGELMANN, F. Cryopreservation of *Prunus* spp. using aluminium cryo-plates. **Scientia Horticulturae**, v. 195, p. 173-182, 2015.

WANG, M. R., HAMBORG, Z., SLIMESTAD, R., ELAMEEN, A., BLYSTAD, D. R., HAUGSLIEN, S., WANG, Q. C. Assessments of rooting, vegetative growth, bulb production, genetic integrity and biochemical compounds in cryopreserved plants of shallot. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 144, n. 1, p. 123-131, 2021

WANG, M., ZHU, P., JIANG, C., MA, L., ZHANG, Z., ZENG, X. Preliminary characterization, antioxidant activity *in vitro* and hepatoprotective effect on acute alcohol-induced liver injury in mice of polysaccharides from the peduncles of *Hovenia dulcis*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 9, p. 2964-2970, 2012.

WANG, M. R., BI, W., SHUKLA, M. R., REN, L., HAMBORG, Z., BLYSTAD, D. R., WANG, Q. C. Epigenetic and genetic integrity, metabolic stability, and field performance of cryopreserved plants. **Plants**, v. 10, n. 9, 1889, 2021.

WANG, R. R., MOU, H. Q., GAO, X. X., CHEN, L., LI, M. F., WANG, Q. C. Cryopreservation for eradication of Jujube witches' broom phytoplasma from Chinese jujube (*Ziziphus jujuba*). **Annals of Applied Biology**, v. 166, n. 2, p. 218-228, 2015.

WANG, T. Y., LI, Q., BI, K. Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 13, n. 1, p. 12-23, 2018.

WANG, Y., LV, W., LI, Y., LIU, D., HE, X., LIU, T. Ampelopsin Improves Cognitive Impairment in Alzheimer's Disease and Effects of Inflammatory Cytokines and Oxidative Stress in the Hippocampus. **Current Alzheimer Research**, v.17, n.1, p. 44-51, 2020.

WINK, M. Annual plant reviews, biochemistry of plant secondary metabolism. John Wiley & Sons, 2011.

WYBOUW, B., DE RYBEL, B. Cytokinin—a developing story. **Trends in Plant Science**, v. 24, n. 2, p. 177-185, 2019.

- XIONG, D., ZHU, J., LIU, C. Effect of ampelopsis extract from young stems and leaves on antimicrobial activities. **Food Science**, v. 21, n. 2, p. 48-50, 2000.
- XIANG, J., ZHU, W., LI, Z., LING, S. Effect of juice and fermented vinegar from *Hovenia dulcis* peduncles on chronically alcohol-induced liver damage in mice. **Food Functional Journal**, v.3, n. 628, 2012.
- XIAO, X. N., WANG, F., YUAN, Y. T., LIU, J., LIU, Y. Z., YI, X. Antibacterial activity and mode of action of dihydromyricetin from *Ampelopsis grossedentata* leaves against food-borne bacteria. **Molecules**, v. 24, n. 15, p. 2831, 2019.
- XU, B. J., DENG, Y. Q., SUNG, C. K. Advances in studies on bioactivity of *Hovenia dulcis*. **Agricultural Chemistry and Biotechnology**, v. 47, n. 1, p. 1-5, 2004.
- XU, B., GANESAN, K., MICKYMARAY, S., ALFAIZ, F. A., THATCHINAMOORTHY, R., AL ABOODY, M. S. Immunomodulatory and antineoplastic efficacy of common spices and their connection with phenolic antioxidants. **Bioactive Compounds in Health and Disease**, v. 3, n. 2, p.15-31, 2020.
- YAMAMOTO, S. I., RAFIQUE, T., PRIYANTHA, W. S., FUKUI, K., MATSUMOTO, T., NIINO, T. Development of a cryopreservation procedure using aluminium cryo-plates. **CryoLetters**, v. 32, n. 3, p. 256-265, 2011.
- YANG, L., LIN, Y. M., HE, Z. W., ZHANG, T. F., LI, Y., XIE, X. T., HE, J. W. Hostaflavanol A, a new anti-inflammatory and antioxidant activities flavanol from the flowers of *Hosta plantaginea*. **Medicinal Chemistry Research**, v. 29, n. 3, p. 426-430, 2020.
- YANG, X., POPOVA, E., SHUKLA, M. R., SAXENA, P. K. Root cryopreservation to biobank medicinal plants: a case study for *Hypericum perforatum* L. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 55, n. 4, p. 392-402, 2019.
- YILDIRIM, A. N., ŞAN, B., YILDIRIM, F., ECEVIT, F. M., ERCIŞLI, S. Micropropagation of promising jujube (*Ziziphus jujuba* Mill.) genotypes. **Erwerbs-Obstbau**, v. 57, n. 3, p. 135-140, 2015.
- YOBOUE, K., ALLA-N'NAN, O., KONAN, J. L. K., SIE, R. S., KOUASSI, M., YAO, S. D. M., KOFFI, B. E. Méthode simple d'échange de germoplasme de cocotier (*Cocos nucifera* L.) par l'utilisation d'embryons zygotiques. **Journal of Applied Biosciences**, v. 80, n. 1, p. 7048-7059, 2014.
- YOSHIKAWA, M., UEDA, T., MURAOKA, O., AOYAMA, H., MATSUDA, H., SHIMODA, H., MURAKAMI, N. Absolute stereostructures of hovenidulciosides A1 and A2, bioactive novel triterpene glycosides from hoveniae semen seu fructus, the seeds and fruit of *Hovenia dulcis* Thunb. **Chemical and pharmaceutical bulletin**, v. 43, n. 3, p. 532-534. 1995.
- YOUL, E. N., OUÉDRAOGO, C. A., GAMBO, M., OUÉDRAOGO, M., KIENDREBÉOGO, M., TRAORÉ, A., GUISSOU, I. P. Antioxidant activity of crude ethanolic extract and fractions of *Ziziphus mauritiana* Lam. (Rhamnaceae) leaves from Burkina Faso. **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology**, v.4, n.30, 2019.
- YUAN-LONG, W. A. N. G., MING-JEN, F. A. N., SONG-IUAN, L. I. A. W. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of papaya (*Carica papaya* L.) by vitrification. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v. 46, 2005.

- YUANYUAN, M., YALI, Z., JIANG, L., HONGBO, S. Roles of plant soluble sugars and their responses to plant cold stress. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 10, 2009.
- YUN, S. M., KIM, Y. S., KIM, K. H., HUR, D. Y. Ampelopsin induces DR5-mediated apoptotic cell death in EBV-infected cells through the p38 pathway. **Nutrition and Cancer**, p.1-6, 2019.
- ZAMECNIK, J., FALTUS, M., & BILAVCIK, A. Vitrification Solutions for Plant Cryopreservation: Modification and Properties. *Plants*, v. 10, n. 12, p. 2623, 2021.
- ZEGEYE, H. *In situ* and *ex situ* conservation: complementary approaches for maintaining biodiversity. **International Journal of Research in Environmental Studies**, n.4, p.1-12, 2016.
- ZENG, S., LIU, D., YE, Y., WANG, L., WANG, W. Anti-tumor effects of ampelopsin on human lung cancer GLC-82 implanted in nude mice. **Journal of Chinese Medicinal Materials**, v. 27, n. 11, p. 842-845, 2004.
- ZHANG, M., ZHANG, S., CUI, P., CHEUNG, P. C. K., WANG, Q. Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, p. 4-19, 2007.

**APÊNDICE** - Artigo publicado na revista: *Plant Cell Tissue and Organ Culture*.

*In vitro propagation and cryopreservation of the medicinal  
species Hovenia dulcis Thunb. (Rhamnaceae)*



## In vitro propagation and cryopreservation of the medicinal species *Hovenia dulcis* Thunb. (Rhamnaceae)

Aline Medeiros Saavedra<sup>1</sup> · Tatiana Carvalho de Castro<sup>1</sup> · Lívia da Silva Cordeiro<sup>1</sup> · Thaís Athayde<sup>1</sup> · Norma Albarello<sup>1</sup> · Claudia Simões-Gurgel<sup>1</sup>

Received: 24 September 2020 / Accepted: 26 November 2020  
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature B.V. part of Springer Nature 2021

### Abstract

This study describes in vitro propagation and cryopreservation of *Hovenia dulcis*, a woody species used in traditional medicine. Stem and leaf explants from axenic seedlings were cultivated on Murashige and Skoog (MS) medium containing 6-benzyladenine (BA) and kinetin (KIN) alone or in combination (0.1, 0.2, 0.5 mg L<sup>-1</sup>). For in vitro propagation, rates of regeneration (percentage of responsive explants) and proliferation (multiplication capacity of explant-derived shoots) were evaluated after 30 days and five subcultures, respectively. For cryopreservation by V Cryo-plate technique, shoot tips were excised from microcuttings cultured from in vitro-grown stock plants, or excised directly from axillary shoots of stock plants. The shoot tips were precultured in 0.3M sucrose (24 h), exposed to loading (20 min) and to PVS2 (0–150 min) before storage in liquid nitrogen. The regrowth was assessed by plating of shoot tips on recovery medium (MS with BA + KIN), with or without a sterile filter paper over the culture medium. Cryopreservation was evaluated by survival (4-weeks) and recovery (8-weeks). The highest regeneration by direct organogenesis (100%) were reached on medium with BA + KIN (0.5 mg L<sup>-1</sup> each). Shoots maintained multiplication capacity, showing the highest proliferation (87%) in the presence of BA. Shoot elongation and rooting were achieved on growth regulator-free MS. The most efficient cryopreservation protocol (68% survival and 62% recovery) applied exposure to PVS2 (120 min), and recovery on medium containing BA + KIN (0.5 mg L<sup>-1</sup> each) with filter paper. The propagation and cryopreservation of *H. dulcis* may contribute to its conservation and that of other woody species.

### Key message

This study aimed to establish an in vitro propagation methodology and the first cryopreservation protocol for *Hovenia dulcis*, a woody species of commercial, medicinal and nutraceutical values.

**Keywords** Conservation · Cytokinins · Japanese raisin tree · Organogenesis · V Cryo-plate

### Abbreviations

BA	6-Benzyladenine
KIN	Kinetin
PVS2	Plant Vitrification Solution 2
MS	Murashige and Skoog (1962) Medium

LN	Liquid Nitrogen
V Cryo-plate	Vitrification Cryo-plate technique

### Introduction

The use of natural products for disease prevention and health care has been described throughout the history of human civilization (Dias et al. 2012). Among natural products, plants have been the most successful sources of potential drugs due to their bioactive compounds produced mainly through secondary metabolism (Dar et al. 2017). However, owing to the variations in natural growth conditions, these compounds are frequently produced in low quantities and at a non-homogeneous level. In addition, the harvest can be

Communicated by: Qiao-Chun Wang.

✉ Claudia Simões-Gurgel  
csimoes04@yahoo.com.br

<sup>1</sup> Laboratório de Biotecnologia de Plantas (Labplan), Núcleo de Biotecnologia Vegetal (NBV), Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG), Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), 524 São Francisco Xavier St., Rio de Janeiro, RJ 20550-013, Brazil



time-consuming and environmentally damaging. Another difficulty for the commercial exploitation of secondary metabolites by conventional propagation methods in tree species is their slow development (Groover 2017; An 2019).

Consequently, *in vitro* culture techniques are used as alternative for the propagation of plant species, which are difficult to raise through conventional methods (Engelmann 2011b). *In vitro* propagation represents an opportunity to obtain plants in large-scale in a reduced space of time (An 2019). It also enhances the quality and quantity of desired plant metabolites by altering growth factors, such as medium, carbon source, and plant growth regulators, thereby overcoming the limitations that occur in the natural environment caused by seasonal and climatic changes (Espinosa-Leal et al. 2018). Furthermore, plant tissue cultures provide new conservation approaches, which contribute to widening the availability of options for storing plant germplasm (González-Arno et al. 2017).

*In vitro* plant collections is an alternative to short-term preservation, however, the maintenance of *in vitro* material under active growing can lead to loss by culture contamination or even occur epigenetic or genetic alterations (Kulus et al. 2020). Therefore, once the material is *in vitro* established, it becomes important to apply long-term conservation approaches to suitable maintenance of the plant genetic resources (Wang et al. 2020b). Cryopreservation, the storage of cells, tissues or organs at the ultra-low temperature of liquid nitrogen ( $-196^{\circ}\text{C}$ ), is the preferable method for the long-term conservation of the biological material. Once cryopreserved, samples are stored safely for unlimited periods due to the interruption of biochemical conditions and most physical processes (Engelmann 2011b; Panis 2019).

A range of cryopreservation techniques are now available for long-term conservation of plant genetic resources, such as woody plant germplasm (Lambardi and Shaarawi 2016; Prudente et al. 2016; Rantala et al. 2019). On the other hand, updated information on technical development and progress in new cryopreservation procedures is still quite limited for forest tree species (Li et al. 2018) as compared to those available for agricultural and horticultural crops, for example, shallot (*Allium cepa* var. *aggregatum*) (Wang et al. 2020a), apple (*Malus domestica*) (Volk et al. 2020) and potato (*Solanum tuberosum* L. ssp. *tuberosum*) (Kaczmarczyk et al. 2011).

*Hovenia dulcis* Thunberg (Rhamnaceae), popularly known as Japanese raisin tree, Japanese grape and chicken-claw pear, is a deciduous tree native to Oriental Asia. The species is used in traditional medicine against intestinal infections and possess anti-asthmatic, antipyretic, diuretic properties, as well as agent to detoxification of alcohol (Lim 2013). It has been reported that extracts from different parts of *H. dulcis* have shown hepatoprotective (Park et al. 2019), antioxidant (Wang et al. 2012), antineoplastic (Morales et al.

2017), neuroprotective (Li et al. 2005), and antiangiogenic (Gadelha et al. 2005) effects. In addition, extracts obtained from *in vitro* cultures have also shown antioxidant (Ribeiro et al. 2015) and antitumor (Castro et al. 2002) properties.

The species *H. dulcis* was introduced and cultivated in several regions of temperate and subtropical areas owing to its valuable wood, ornamental features and edible fruits (Guidini et al. 2017). Despite its commercial and, mainly, medicinal interest, it is considered an invasive species in forest ecosystems in South America (Schmidt et al. 2020). In Brazil, according to Hedges et al. (2012), it is an invasive species, competing with native species for space, light and nutrients, thus reducing the availability of these resources. These characteristics show the importance of *in vitro* cultivation of the species, allowing its commercial exploitation without environmental impacts.

Taking into account these aspects, the present research describes a two-step study of *in vitro* propagation and cryopreservation of *H. dulcis* shoot tips. In the first part, *in vitro* propagation was established, evaluating the regeneration rate of different explants from seedlings obtained *in vitro*, as well as the multiplication capacity (proliferation rate) over time in culture of explant-derived shoots. In the second part, cryopreservation of *in vitro* propagated plants was established by vitrification using aluminium cryo-plates (V Cryo-plate technique). This long-term conservation technique has advantages such as very rapid cooling and warming rates, which protect explants from freezing damage (Yamamoto et al. 2011). V Cryo-plate has been successfully applied in plant cryopreservation, including fruits species such as *Fragaria x ananassa* (Yamamoto et al. 2012), species of genera *Prunus* (Vujović et al. 2015) and *Vitis* (Bettoni et al. 2019c), and medicinal species such as *Cleome rosea* (Cordeiro et al. 2015, 2017), *Cleome spinosa* (Vilardo et al. 2019), *Petiveria alliacea* (Pettinelli et al. 2017, 2020) and *Passiflora suberosa* (Vianna et al. 2019).

Considering the commercial interest in the family Rhamnaceae, this study contributes to biotechnological research related to *in vitro* propagation and long-term conservation by V Cryo-plate cryopreservation technique of other woody species of commercial, medicinal and nutraceutical importance, especially those species belonging to the Rhamnaceae family.

## Materials and Methods

### *In vitro* propagation

#### Plant material

Ripe fruits of *Hovenia dulcis* Thunberg were collected in Teresópolis, Rio de Janeiro State, Brazil (22°26'23"S

42°58'36"W). A voucher specimen (HRJ 1426) was deposited in the Herbarium of Rio de Janeiro State University, Rio de Janeiro State, Brazil. The seeds were germinated under in vitro conditions according to Castro et al. (2005). Briefly, seeds were mechanically scarified with sandpaper No. 120 and disinfected in a laminar flow with 5% (w/v) sodium hypochlorite (NaOCl) solution and 0.05% Tween 80 (v/v) for 45 min. Then, seeds were rinsed three times with sterile distilled water. The seeds were inoculated in flasks (6.0×8.0 cm) containing 30 mL of MS medium (Murashige and Skoog 1962) devoid of growth regulators (MS0), supplemented with 0.09 M sucrose and solidified with 8 g L<sup>-1</sup> agar (Sigma-Aldrich®). The medium pH was adjusted to 5.8 prior to autoclaving at 121 °C for 15 min. The flasks were maintained in a growth chamber at 26 ± 2 °C and 16 h photoperiod provided by cool white fluorescent tubes (45 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>).

#### Bud induction and shoot regeneration

Forty-day-old seedlings (Castro et al. 2005) from *H. dulcis* were used as source of stem (hypocotyl and epicotyl with 0.8 cm in length) and leaf (1.0 cm<sup>2</sup>) explants that were inoculated on MS medium solidified with 8 g L<sup>-1</sup> agar and supplemented with 6-benzyladenine (BA) and kinetin (KIN) in different concentrations (0, 0.1, 0.2, and 0.5 mg L<sup>-1</sup>) used alone or in combination. The medium pH was adjusted to 5.8 prior to autoclaving at 121 °C for 15 min. The cultures were maintained in flasks (6.0×8.0 cm) with 30 mL of culture medium that remained in the same physical conditions described above in relation to seed germination. The hypocotyl and epicotyl explants were inoculated according to organ polarity, and the leaf explants were inoculated with their abaxial surface in contact with the culture medium. After 30 days in culture, the regeneration rate (percentage of explants that induced shoots) and the mean number of shoots per explant were evaluated.

#### Primary explant-derived shoot cultures

Shoots (≥ 0.5 cm in length) obtained from stem explants after 30 days in culture were isolated and subcultured onto a fresh medium (same composition those used to primary explant cultures) at 30-day intervals during five subcultures. The percentage of explant-derived shoots with multiplication capacity (proliferation rate) and the mean number of shoots were evaluated after each subculture and represented in the results by the average of the five subcultures.

#### Elongation and rooting

To evaluate the elongation and rooting, shoots (≥ 1.0 cm in length) developed after five subcultures, using the in vitro

propagation protocol defined as the most efficient, were transferred to MS0 medium. The cultures were maintained for 45 days under the same physical conditions described before. After this period, were evaluated the shoot height, the number and length of roots and the rooting percentage.

### Cryopreservation

#### Plant material

The in vitro propagated plants established in the first part of this study were used as source of shoot tips for cryopreservation. The shoot tips were excised from microcuttings cultured from the in vitro-grown stock plants, or directly from axillary shoots of stock plants. Microcuttings (1.0 cm in length) with one to two nodes with one to two nodes were isolated from 60-day-old in vitro stock plants and inoculated in culture flasks (6.0×8.0 cm) with 30 mL of MS0 medium with a density of five microcuttings per flask and cultured under the same conditions as the in vitro stock cultures. After 3 weeks, the shoot tips (~ 2.0 mm in length) were isolated and used in the cryopreservation experiments. Shoot tips (~ 2.0 mm in length) isolated directly from in vitro propagated plants that showed break of dormancy of axillary buds were also used in cryopreservation. These shoot tips were obtained from axillary shoots developed along the entire stem, regardless of the bud position. To maintain the stock plants, at each 60 days in culture, the apical segments (1–2 cm in length) were isolated and transferred to fresh medium supplemented with the best combination of cytokinins previously established in the in vitro propagation studies.

#### Preculture and cryopreservation by V Cryo-plate technique

The shoot tips were precultured on MS medium supplemented with 0.3 M sucrose, 8 g L<sup>-1</sup> agar at pH 5.8 on Petri dishes (90×15 mm) at room temperature (26 ± 2 °C) for 24 h in darkness. Then, precultured shoot tips were adhered to aluminium cryo-plates No. 3 (Niino et al. 2014). A droplet (2 μL) of 3% (w/v) sodium alginate (low viscosity, Sigma-Aldrich® A2158) solution in calcium-free MS basal medium (supplemented with 0.09 M sucrose), both at pH 5.8, was placed in each well of the cryo-plate. The precultured shoot tips were placed individually into each well and covered with a droplet (2 μL) of sodium alginate solution, followed by polymerization by the addition of calcium chloride solution (100 mM CaCl<sub>2</sub> in MS medium containing 0.09 M sucrose) on the surface of the cryo-plates. After 15 min, at room temperature, polymerization was completed, and the CaCl<sub>2</sub> solution was removed with a pipette and gently tapping the cryo-plates on filter paper. Shoot tips adhering to the cryo-plates were treated for 20 min at room



temperature with loading solution (0.4 M sucrose and 2.0 M glycerol in MS medium; Nishizawa et al. 1993) and then exposed to vitrification solution PVS2 (30% [w/v] glycerol, 15% [w/v] DMSO, 15% [w/v] ethylene glycol, and 0.4 M sucrose [13.7% (w/v)] in MS medium; Sakai et al. 1990) at 0 °C for 0, 15, 30, 60, 90, 120 or 150 min. The cryo-plates were transferred to uncapped 2-mL cryovials filled with liquid nitrogen (LN) and maintained in LN for at least 15 min. As control, shoot tips were precultured, adhered to the cryo-plates, and exposed to loading, PVS2, and unloading solutions, but without immersion in LN (-LN). For rewarming, the cryo-plates were immersed in unloading solution (MS medium containing 1.2 M sucrose) for 15 min at room temperature.

The shoot tips were removed from the cryo-plates using a scalpel blade and transferred to the following recovery medium formulations:

1. MS medium solidified with 8 g L<sup>-1</sup> agar and supplemented with BA + KIN (0.2 mg L<sup>-1</sup> BA + 0.2 mg L<sup>-1</sup> KIN or 0.5 mg L<sup>-1</sup> BA + 0.5 mg L<sup>-1</sup> KIN) at pH 5.8 or.
2. Sterilized filter paper (Whatman n°1) disc laid over MS medium solidified with 8 g L<sup>-1</sup> agar (to provide a more gradual rehydration of the material) supplemented with 0.5 mg L<sup>-1</sup> BA + 0.5 mg L<sup>-1</sup> KIN at pH 5.8.

Cultures were maintained for 1 week at 26 ± 2 °C in the dark. They were then transferred to light intensity 20 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, for 2 weeks, before being exposed to light under standard conditions (45 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>). The shoot tips inoculated on filter paper were transferred to the same culture conditions, but without filter paper after the dark period.

The solutions used on cryopreservation assays were adjusted to pH 5.8. Loading, PVS2 and Unloading solutions were sterilized by filtration using a vacuum filter system (Nalgene®). The culture media, sodium alginate solution and calcium chloride solution were autoclaved as described above.

Figure 1 shows the V Cryo-plate protocol applied to cryopreservation of shoot tips of *H. dulcis*.

### Assessment of survival and recovery

The parameters evaluated to determine the efficiency of the cryopreservation were: (1) survival (percentage of shoot tips presenting green color and early growth) 4 weeks after rewarming and (2) recovery (percentage of shoot tips that developed into normal shoots ≥ 0.5 cm in length) 8 weeks after rewarming. Survival and recovery were expressed based on the total number of shoot tips treated. Due to the capacity for multi-shooting proliferation observed in the *in vitro* plants of *H. dulcis*, it was also evaluated the average number of new shoots produced per recovered plant, 16 weeks after cryopreservation, was also evaluated.

### Statistical analysis

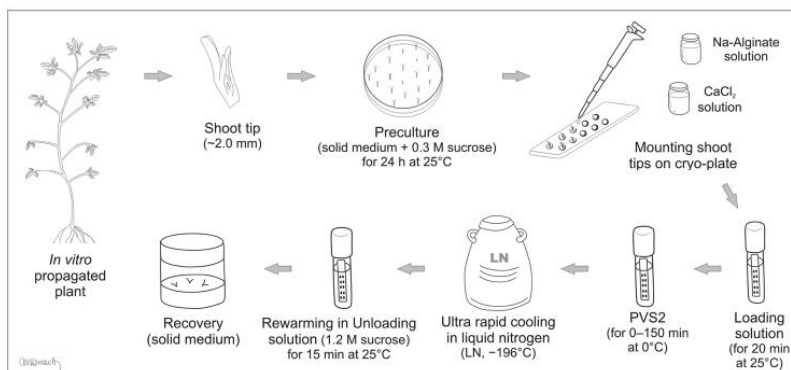
For *in vitro* propagation assays, 20 explants were used per treatment (five explants per flask). To evaluate the elongation and rooting steps, the experiment consisted of 50 shoots (five shoots per flask). For cryopreservation assays, 10 shoot tips per cryo-plate were used per treatment. Data were analyzed using the statistical software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). Statistical analysis was performed using analysis of variance (ANOVA), and the means were compared by Tukey test at 5% probability ( $p \leq 0.05$ ). All assays were performed using three repetitions and the results were presented as means ± standard error.

## Results

### Bud induction and shoot regeneration

Adventitious buds were induced by direct organogenesis from stem explants of *H. dulcis* between the second and third

**Fig. 1** V Cryo-plate protocol applied to shoot tips of *Hovenia dulcis*





week in culture. The propagation capacity was incremented on media supplemented with cytokinins and no morphogenic response was obtained from leaf explants.

Regeneration rates from hypocotyl explants did not show statistically significant differences for most treatments applied, although the highest response did not exceed 35% (Table 1). However, explants inoculated on media supplemented with the highest concentration of BA ( $0.5 \text{ mg L}^{-1}$ ) combined with KIN showed bud initiation, but without shoot development. Taking into account the mean number of shoots per explant, usually the explants maintained in the presence of BA alone and on media supplemented with  $0.1 \text{ mg L}^{-1}$  BA combined with KIN reached the highest propagation capacity ( $2.33 \pm 0.94$ ) (Table 1).

Epicotyl explants inoculated on media with KIN only did not exceed regenerated rates of 15%, while supplementation with BA only was more effective for bud induction. Explants cultivated on medium with  $0.1 \text{ mg L}^{-1}$  BA reached a regeneration rate of 85% (Table 1). However, the highest percentages of epicotyl explants that induced shoots were 95 and 100% when explants were inoculated on media supplemented with  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  BA combined with  $0.2 \text{ mg L}^{-1}$  or  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  KIN. Explants maintained on these media also reached the highest mean number of shoots per explant (2.06 and 2.08, respectively) (Table 1).

### Proliferation rate from primary explant-derived shoots

Newly developed shoots obtained from hypocotyl and epicotyl explants maintained their proliferation capacity during five subcultures. Shoots cultivated on media supplemented with BA alone or in combination with KIN showed the highest proliferation rates as compared to cultures maintained in the presence of KIN alone or MSO (Table 2).

The hypocotyl explant-derived shoots showed an increase in multiplication capacity as compared to the original hypocotyl explants since the proliferation rates (Table 2) were higher than the regeneration rates in all treatments (Table 1). Moreover, supplementation with BA only resulted in higher proliferation rates (70–87%) when compared to shoots cultivated on media with the addition of BA and KIN (48–77%) (Table 2).

Epicotyl explant-derived shoots maintained high multiplication capacity (Table 2; Fig. 2a). The highest proliferation rate (87%) and mean number of shoots ( $3.2 \pm 0.24$ ) occurred in explants inoculated on  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  BA together with  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  KIN. As previously observed for cultures initiated with the original epicotyl and hypocotyl explants, the epicotyl explant-derived shoots showed higher

**Table 1** Effect of BA and KIN on the regeneration rate and mean number of shoots produced from stem explants of *H. dulcis*, after 30 days in culture

Growth regulator ( $\text{mg L}^{-1}$ )		Hypocotyl		Epicotyl	
BA	KIN	Regeneration rate (%) <sup>*</sup>	Mean number of shoots/explant <sup>**</sup>	Regeneration rate (%) <sup>*</sup>	Mean number of shoots/explant <sup>**</sup>
–	–	20.0 ± 8.2 <sup>a</sup>	1.00 ± 0.11 <sup>b</sup>	10.0 ± 5.8 <sup>d</sup>	1.00 ± 0.15 <sup>c</sup>
–	0.1	35.0 ± 9.6 <sup>a</sup>	1.13 ± 0.12 <sup>b</sup>	10.0 ± 5.9 <sup>d</sup>	1.00 ± 0.40 <sup>c</sup>
–	0.2	15.0 ± 5.0 <sup>a</sup>	1.33 ± 0.24 <sup>a</sup>	10.0 ± 5.1 <sup>d</sup>	1.00 ± 0.41 <sup>c</sup>
–	0.5	15.0 ± 9.6 <sup>a</sup>	1.25 ± 0.10 <sup>b</sup>	15.0 ± 9.6 <sup>d</sup>	1.25 ± 0.25 <sup>c</sup>
0.1	–	35.0 ± 12.6 <sup>a</sup>	2.22 ± 0.16 <sup>a</sup>	85.0 ± 9.5 <sup>a</sup>	1.00 ± 0.00 <sup>c</sup>
0.1	0.1	20.0 ± 8.2 <sup>a</sup>	2.33 ± 0.94 <sup>a</sup>	85.0 ± 9.6 <sup>a</sup>	1.10 ± 0.05 <sup>c</sup>
0.1	0.2	5.0 ± 3.0 <sup>b</sup>	2.00 ± 0.10 <sup>a</sup>	100.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	1.25 ± 0.01 <sup>c</sup>
0.1	0.5	5.0 ± 3.0 <sup>b</sup>	2.00 ± 0.09 <sup>a</sup>	85.0 ± 5.0 <sup>a</sup>	1.73 ± 0.16 <sup>b</sup>
0.2	–	10.0 ± 10.0 <sup>a</sup>	2.00 ± 0.10 <sup>a</sup>	35.0 ± 9.6 <sup>c</sup>	1.56 ± 0.16 <sup>b</sup>
0.2	0.1	30.0 ± 12.9 <sup>a</sup>	1.83 ± 0.31 <sup>a</sup>	80.0 ± 8.2 <sup>a</sup>	1.59 ± 0.16 <sup>b</sup>
0.2	0.2	30.0 ± 17.3 <sup>a</sup>	1.25 ± 0.18 <sup>b</sup>	35.0 ± 12.6 <sup>c</sup>	1.60 ± 0.15 <sup>b</sup>
0.2	0.5	15.0 ± 5.0 <sup>a</sup>	2.33 ± 0.62 <sup>a</sup>	70.0 ± 12.9 <sup>b</sup>	1.61 ± 0.15 <sup>b</sup>
0.5	–	35.0 ± 15.0 <sup>a</sup>	2.22 ± 0.55 <sup>a</sup>	45.0 ± 12.6 <sup>c</sup>	1.46 ± 0.16 <sup>b</sup>
0.5	0.1	0 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>	45.0 ± 12.6 <sup>c</sup>	1.54 ± 0.21 <sup>b</sup>
0.5	0.2	0 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>	95.0 ± 5.0 <sup>a</sup>	2.06 ± 0.16 <sup>a</sup>
0.5	0.5	0 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>	100.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	2.08 ± 0.28 <sup>a</sup>

Means followed by the same letter in each column are not significantly different by Tukey's test ( $p \leq 0.05$ )

Data represent mean ± standard error

<sup>\*</sup>Regeneration rate = % of explants that induced shoots

<sup>\*\*</sup>Mean number of shoots = mean number of shoots per explant

**Table 2** Effect of BA and KIN on the proliferation rate and mean number of shoots produced from primary hypocotyl and epicotyl-derived shoots of *H. dulcis*, after five multiplication cycles

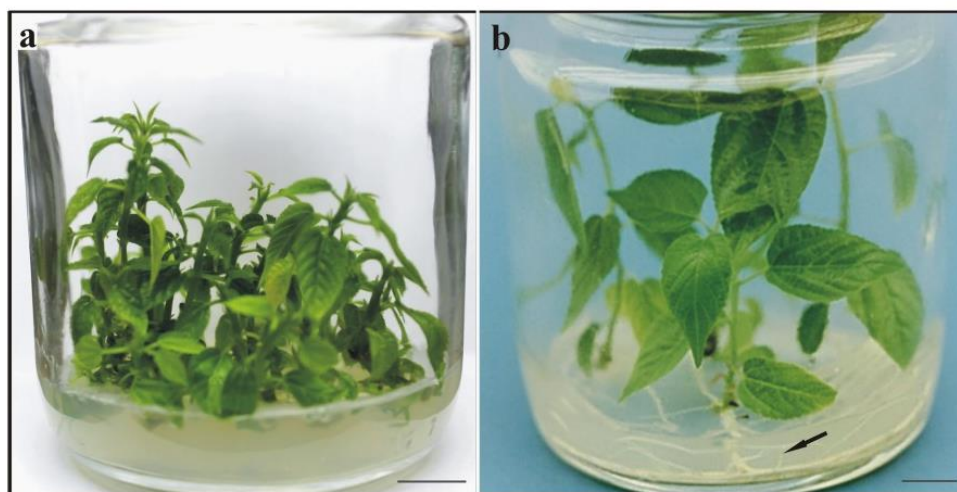
Growth regulator (mg L <sup>-1</sup> )		Hypocotyl		Epicotyl	
BA	KIN	Proliferation rate (%)*	Mean number of shoots**	Proliferation rate (%)*	Mean number of shoots**
–	–	35.0 ± 8.1 <sup>d</sup>	1.45 ± 0.14 <sup>c</sup>	40.0 ± 5.7 <sup>d</sup>	1.83 ± 0.11 <sup>c</sup>
–	0.1	45.0 ± 4.5 <sup>c</sup>	1.33 ± 0.08 <sup>c</sup>	40.0 ± 4.5 <sup>d</sup>	1.72 ± 0.09 <sup>c</sup>
–	0.2	43.0 ± 6.4 <sup>c</sup>	1.81 ± 0.14 <sup>b</sup>	40.0 ± 3.9 <sup>d</sup>	1.54 ± 0.11 <sup>d</sup>
–	0.5	65.0 ± 7.2 <sup>b</sup>	1.91 ± 0.27 <sup>b</sup>	47.0 ± 3.0 <sup>d</sup>	1.74 ± 0.13 <sup>c</sup>
0.1	–	87.0 ± 4.1 <sup>a</sup>	2.69 ± 0.23 <sup>a</sup>	82.0 ± 7.2 <sup>a</sup>	2.87 ± 0.55 <sup>a</sup>
0.1	0.1	77.0 ± 10.9 <sup>a</sup>	2.70 ± 0.40 <sup>a</sup>	80.0 ± 7.2 <sup>a</sup>	2.87 ± 0.61 <sup>a</sup>
0.1	0.2	48.0 ± 7.3 <sup>c</sup>	1.86 ± 0.19 <sup>b</sup>	57.0 ± 14.5 <sup>c</sup>	2.06 ± 0.21 <sup>b</sup>
0.1	0.5	54.0 ± 11.3 <sup>b</sup>	2.44 ± 0.43 <sup>a</sup>	57.0 ± 10.1 <sup>c</sup>	2.47 ± 0.37 <sup>b</sup>
0.2	–	70.0 ± 9.6 <sup>a</sup>	2.38 ± 0.14 <sup>a</sup>	68.0 ± 7.5 <sup>b</sup>	2.06 ± 0.30 <sup>b</sup>
0.2	0.1	61.0 ± 13.0 <sup>b</sup>	2.45 ± 0.16 <sup>a</sup>	65.0 ± 5.2 <sup>c</sup>	2.01 ± 0.33 <sup>b</sup>
0.2	0.2	68.0 ± 11.8 <sup>b</sup>	2.70 ± 0.24 <sup>a</sup>	62.0 ± 3.0 <sup>c</sup>	2.21 ± 0.44 <sup>b</sup>
0.2	0.5	69.0 ± 7.0 <sup>b</sup>	2.15 ± 0.28 <sup>a</sup>	69.0 ± 8.7 <sup>b</sup>	1.82 ± 0.26 <sup>b</sup>
0.5	–	87.0 ± 9.7 <sup>a</sup>	2.66 ± 0.40 <sup>a</sup>	69.0 ± 6.4 <sup>b</sup>	2.06 ± 0.34 <sup>b</sup>
0.5	0.1	–	–	74.0 ± 3.5 <sup>b</sup>	2.84 ± 0.49 <sup>a</sup>
0.5	0.2	–	–	83.0 ± 5.4 <sup>a</sup>	3.03 ± 0.12 <sup>a</sup>
0.5	0.5	–	–	87.0 ± 3.4 <sup>a</sup>	3.22 ± 0.24 <sup>a</sup>

Means followed by the same letter in each column are not significantly different by Tukey's test ( $p \leq 0.05$ )

\*Proliferation rate = % of explant-derived shoots with multiplication capacity. Data represent mean ± standard error of the five subcultures

\*\*Mean number of shoots = mean number of shoots per explant-derived shoot. Data represent mean ± standard error of the five subcultures

(–) = data not obtained due to no development of shoots from hypocotyl explants in shoot regeneration assays



**Fig. 2** In vitro propagated plants of *Hovenia dulcis*. **a** Shoot propagation on MS medium with 0.5 mg L<sup>-1</sup> BA + 0.5 mg L<sup>-1</sup> KIN after five subcultures. **b** Shoot elongation and rooting (arrow) after 45 days in culture on MS0 medium. Bars = 1.0 cm



multiplication capacity than hypocotyl explant-derived shoots (Table 2).

### Elongation and rooting

Shoots propagated on medium supplemented with  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  BA +  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  KIN were transferred to MS0 medium. After 45 days in culture on the cytokinin-free medium an increase in shoot height ranging from 55 to 65% was observed. The culture on MS0 also induced rhizogenesis in *H. dulcis*. The development of roots was reached by 85% of shoots after 45 days. The radicular system was constituted by one to five thin, white and hairy roots with 4.0 to 10.0 cm in length and few branched (Fig. 2b).

Since in vitro propagated plants showed a normal phenotypical aspect, they were used as source material during the second step of this work: the establishment of protocols for long-term conservation by cryopreservation.

### Cryopreservation by V Cryo-plate technique

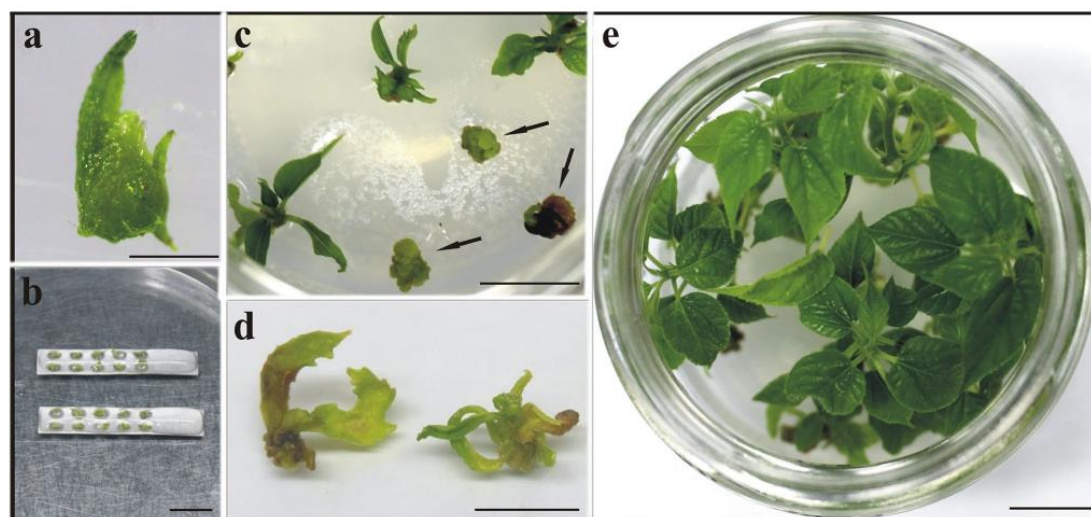
Shoot tips precultured on media with 0.3 M sucrose followed by inoculation on culture medium with the same composition used in the maintenance of in vitro propagated plants (MS with  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  BA +  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  KIN), regenerated normal plantlets. This result demonstrated that the preculture step did not reduced the recovery capacity (data not shown).

### Survival and recovery of cryopreserved shoot tips isolated from microcuttings

Shoot tips (Fig. 3a) that adhered to the cryo-plates (Fig. 3b) were cryopreserved and inoculated on the recovery medium with the addition of BA and KIN at  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$ . The non-cryopreserved shoot tips (–LN) had the survival ranging from 86 to 100% and the recovery ranging from 53 to 93% along PVS2 exposure times. There were no differences in the survival and recovery levels of –LN shoot tips that were exposed to 0–150 min to PVS2 (Table 3).

Cryopreserved shoot tips (+LN) that were not exposed to PVS2, or exposed for only 15 min, did not survive, becoming whitish after the first week of culture on recovery medium, even when kept in the dark (Table 3). The survival and recovery levels of LN-exposed (+LN) shoot tips increased as the PVS2 exposure time was increased from 30 to 120 min and decreased at 150 min. Shoot tips dehydrated in PVS2 for 120 min had the highest level of survival of the 87% and recovery of the 45% after LN exposure. The shoot tips started to grow 2 weeks after cryopreservation, showing green color and leaf primordia development. As previously observed in the in vitro propagated plants, multiple shoots were induced on the cryopreserved shoot tips over time in culture.

Some shoot tips showed callogenesis after transference to the recovery medium (Fig. 3c). They were considered in the quantification of survival since callus is a morphogenic response of living cells and capable of redifferentiation.



**Fig. 3** Cryopreservation of shoot tips of *Hovenia dulcis*. **a** Isolated shoot tip. **b** Shoot tips adhered on the cryo-plates. **c** Post-cryopreservation recovery plants after 4 weeks, presenting callus formation

(arrows). **d** Hyperhydric plants after cryopreservation. **e** Plants regenerated from cryopreservation after 16 weeks. Bar (**a**) = 1.0 mm. Bars (**b**, **c**, **d**, **e**) = 1.0 cm

**Table 3** Effect of exposure to PVS2 on survival and recovery of control (–LN) and cryopreserved (+LN) shoot tips from microcuttings\* of *H. dulcis*, cryopreserved by V Cryo-plate technique, after recovery on MS medium with 0.5 mg L<sup>-1</sup> BA + 0.5 mg L<sup>-1</sup> KIN

Exposure time (min)	Survival (%)		Recovery (%)	
	–LN	+LN	–LN	+LN
0	100.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>b</sup>	65.00 ± 5.00 <sup>b</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>b</sup>
15	100.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>b</sup>	80.00 ± 20.00 <sup>ab</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>b</sup>
30	100.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	35.45 ± 8.67 <sup>ab</sup>	68.52 ± 7.10 <sup>b</sup>	21.59 ± 2.78 <sup>ab</sup>
60	86.67 ± 6.67 <sup>a</sup>	73.33 ± 14.53 <sup>a</sup>	73.89 ± 3.89 <sup>b</sup>	30.00 ± 10.00 <sup>ab</sup>
90	91.11 ± 4.84 <sup>a</sup>	79.44 ± 10.82 <sup>a</sup>	66.67 ± 8.87 <sup>b</sup>	43.61 ± 4.72 <sup>a</sup>
120	100.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	87.73 ± 6.33 <sup>a</sup>	93.33 ± 6.67 <sup>a</sup>	45.45 ± 12.41 <sup>a</sup>
150	100.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	70.00 ± 10.00 <sup>a</sup>	53.33 ± 3.33 <sup>b</sup>	33.33 ± 12.02 <sup>ab</sup>

\*Microcuttings cultured from in vitro-grown stock plants

Data represent mean ± standard error

Means followed by the same letter in each column are not significantly different by Tukey's test ( $p \leq 0.05$ )

However, they were not considered for the recovery rate since they did not develop a plant. In addition, some plants developed from cryopreserved shoot tips showed a hyperhydric aspect between the first and the second week after recovery (Fig. 3d). However, this characteristic was no longer observed after the first subculture. 4 months after the cryopreservation process, healthy plants were obtained with an aspect similar to that of the in vitro propagated plants.

Reduction in the concentration of cytokinins in the recovery medium (0.2 mg L<sup>-1</sup> BA + 0.2 mg L<sup>-1</sup> KIN) did not inhibit the occurrence of callogenesis or hyperhydricity. Taking into account the results previously observed, only exposure times to PVS2 from 60 to 150 min were used in this experiment. Non-cryopreserved shoot tips reached survival rates between 83 and 96% (Table 4). The highest recovery capacity was achieved for shoot tips exposed to PVS2 for 120 min (72%), however, it was statistically non-significant than in other treatments. For cryopreserved shoot tips maximum values of both survival (63%) and recovery (40%) were reached after 150 min of PVS2 exposure (Table 4). Unexpectedly, reduction in the concentration of cytokinins in the recovery medium caused an increase in callogenesis or hyperhydricity in

plants regenerated from cryopreserved shoot tips and also in some plants developed from non-cryopreserved shoot tips (data not shown). However, as previously observed, the hyperhydric aspect was not maintained throughout the subcultures, and the plants recovered a normal phenotypic aspect.

When filter paper was used over the recovery medium for non-cryopreserved shoot tips, high survival rates (96–100%) were observed for all exposure times to PVS2. Moreover, there was no influence of the dehydration duration on the recovery rates (60–92%) (Table 5). For cryopreserved material, the exposure to PVS2 for over 60 min resulted in high survival (62–77%). The highest recovery rates (43–62%) were found after 120–150 min dehydration (Table 5).

The use of filter paper resulted in regenerated plants that started to grow at the beginning of the second week of culture on recovery medium, showing the development of leaf primordia of dark green color. During their growth, these plants showed morphology similar to that of in vitro propagated plants. After 4 monthly subcultures (Fig. 3e), these plants maintained their capacity to produce multiple shoots, reaching a number of 2–5 (–LN) and 4–7 (+LN) shoots per post-cryopreservation recovered plant (Table 5).

**Table 4** Effect of exposure to PVS2 on survival and recovery of control (–LN) and cryopreserved (+LN) shoot tips from microcuttings\* of *H. dulcis*, cryopreserved by V Cryo-plate technique, after recovery on MS medium with 0.2 mg L<sup>-1</sup> BA + 0.2 mg L<sup>-1</sup> KIN

Exposure time (min)	Survival (%)		Recovery (%)	
	–LN	+LN	–LN	+LN
60	95.00 ± 2.89 <sup>a</sup>	40.00 ± 5.77 <sup>ab</sup>	56.67 ± 14.53 <sup>a</sup>	22.50 ± 4.79 <sup>a</sup>
90	83.33 ± 6.67 <sup>a</sup>	51.11 ± 10.60 <sup>ab</sup>	70.00 ± 00.00 <sup>a</sup>	23.33 ± 3.33 <sup>a</sup>
120	83.89 ± 9.73 <sup>a</sup>	32.50 ± 7.50 <sup>b</sup>	72.50 ± 4.79 <sup>a</sup>	26.67 ± 6.67 <sup>a</sup>
150	96.67 ± 3.33 <sup>a</sup>	63.33 ± 3.33 <sup>a</sup>	66.67 ± 8.82 <sup>a</sup>	40.00 ± 5.77 <sup>a</sup>

\*Microcuttings cultured from in vitro-grown stock plants

Data represent mean ± standard error

Means followed by the same letter in each column are not significantly different by Tukey's test ( $p \leq 0.05$ )



**Table 5** Effect of exposure to PVS2 and use of filter paper over the recovery medium (0.5 mg L<sup>-1</sup> BAP+0.5 mg L<sup>-1</sup> KIN) on survival, recovery and shoot proliferation of control (-LN) and cryopreserved (+LN) shoot tips from microcuttings\* of *H. dulcis*, cryopreserved by V Cryo-plate technique

Exposure time (min)	Survival (%)		Recovery (%)		Mean number of shoots/recovered plant	
	-LN	+LN	-LN	+LN	-LN	+LN
60	100.00±0.00 <sup>a</sup>	46.39±8.66 <sup>b</sup>	92.59±3.70 <sup>a</sup>	17.50±0.83 <sup>c</sup>	5.4±1.9 <sup>a</sup>	7.4±1.4 <sup>a</sup>
90	96.67±3.33 <sup>a</sup>	77.50±5.77 <sup>a</sup>	80.30±10.15 <sup>a</sup>	39.63±8.02 <sup>b</sup>	2.8±0.4 <sup>d</sup>	4.3±1.4 <sup>d</sup>
120	97.50±2.89 <sup>a</sup>	68.00±8.66 <sup>ab</sup>	64.91±7.10 <sup>a</sup>	62.00±4.79 <sup>a</sup>	3.1±1.0 <sup>d</sup>	4.8±0.9 <sup>d</sup>
150	96.67±3.33 <sup>a</sup>	62.50±2.50 <sup>ab</sup>	60.00±7.07 <sup>a</sup>	43.33±3.33 <sup>ab</sup>	3.9±0.9 <sup>d</sup>	5.6±1.4 <sup>d</sup>

\*Microcuttings cultured from in vitro-grown stock plants

Data represent mean ± standard error

Means followed by the same letter in each column are not significantly different by Tukey's test ( $p \leq 0.05$ )

### Survival and recovery of cryopreserved shoot tips isolated directly from axillary shoots of stock plants

The most suitable cryopreservation protocol applied to shoot tips from microcuttings, was selected to be used with shoot tips excised directly from developed axillary shoots.

The non-cryopreserved shoot tips reached survival rates above 91% for all PVS2 exposure times, and there was no influence of dehydration duration in the vitrification solution on the recovery rate (62–80%) (Table 6). For cryopreserved shoot tips, maximal survival (75%) and recovery (45%) values were achieved after exposure to PVS2 for 120 min (Table 6).

1 week after cryopreservation, the shoot tips developed dark green leaf primordia. The regenerated plants showed normal development and maintained their capacity for multi-shooting proliferation, reaching a number of 3–5 (-LN) and 3–6 (+LN) shoots per recovered plant after the cryopreservation process (Table 6).

### Discussion

This study evaluated the in vitro propagation of *H. dulcis* using stem and leaf explants from axenic seedlings and also established the cryopreservation of in vitro-derived shoot tips.

### In vitro propagation

According to Castro et al. (2014), in vitro germination allows the establishment of efficient methods to supply a stock of plants in excellent phytosanitary conditions to be used as a source of explants for plant tissue culture. In addition, seedlings are useful as a source of plant material with higher morphogenetic potential.

Important steps in the establishment of in vitro germplasm collections are the induction and multiplication of shoots (Manole-Paunescu 2014; Li et al. 2018). Nevertheless, the development of in vitro protocols for woody species is a challenge because of such factors as recalcitrance

**Table 6** Effect of exposure to PVS2 and use of filter paper over the recovery medium (0.5 mg L<sup>-1</sup> BAP+0.5 mg L<sup>-1</sup> KIN) on survival, recovery and shoot proliferation of control (-LN) and cryopreserved (+LN) shoot tips excised directly from axillary shoots\* of *H. dulcis*, cryopreserved by V Cryo-plate technique

Exposure time (min)	Survival (%)		Recovery (%)		Mean number of shoots/recovered plant	
	-LN	+LN	-LN	+LN	-LN	+LN
60	100.00±0.00 <sup>a</sup>	45.00±25.00 <sup>a</sup>	75.00±5.00 <sup>a</sup>	25.00±15.00 <sup>b</sup>	3.0±0.0 <sup>d</sup>	2.7±1.7 <sup>a</sup>
90	96.67±3.33 <sup>a</sup>	60.00±20.82 <sup>a</sup>	80.56±6.26 <sup>a</sup>	36.67±14.53 <sup>a</sup>	3.3±0.4 <sup>d</sup>	2.8±0.9 <sup>d</sup>
120	92.50±7.50 <sup>a</sup>	75.00±10.41 <sup>a</sup>	62.50±14.36 <sup>a</sup>	45.00±6.45 <sup>a</sup>	4.5±1.3 <sup>d</sup>	3.1±0.3 <sup>d</sup>
150	91.67±8.33 <sup>a</sup>	64.44±12.81 <sup>a</sup>	64.81±24.00 <sup>a</sup>	11.67±7.26 <sup>b</sup>	2.6±1.1 <sup>d</sup>	6.0±2.0 <sup>d</sup>

\*Axillary shoots developed on in vitro-grown stock plants

Data represent mean ± standard error

Means followed by the same letter in each column are not significantly different by Tukey's test ( $p \leq 0.05$ )

and prolonged juvenile stage (Read and Bavougian 2012). Additionally, the production of phenolic compounds during the process of explant excision can lead to oxidation and loss of viability (Bonga et al. 2010).

The shoot propagation of *H. dulcis* from stem explants was achieved by direct organogenesis. This propagation pathway reduces the risk of somaclonal variations when compared to indirect organogenesis (Zayova et al. 2010). Moreover, the propagation capacity was incremented on media supplemented with cytokinins, highlighting the presence of BA. Among the cytokinins used in in vitro propagation, BA has been mentioned as the most efficient for regenerating shoots for many species (Yuniastuti et al. 2016; Aros et al. 2017; Pereira et al. 2018; Serafim et al. 2018).

The difference in propagation capacity observed between hypocotyl and epicotyl explants, as well as the non-morphogenetic response that occurred in leaf explants, may be related to differences in tissue and cell differentiation, as well as the endogenous balance of auxins and cytokinins (George et al. 2008).

The in vitro propagation of *H. dulcis* was previously evaluated through protocols of indirect organogenesis (Jeong et al. 2009), indirect somatic embryogenesis (Yang et al. 2013) and direct organogenesis (Echeverrigaray et al. 1998; Park et al. 2006). In these studies, use of the cytokinins BA and KIN also proved to be efficient for inducing morphogenic response. However, no studies have ever evaluated multiplication capacity over time in culture of explant-derived shoots, such as that performed in the present work. These newly developed shoots maintained multiplication capacity by direct organogenesis throughout the subcultures, when compared to the original explants, demonstrating the viability of the protocol in mass production of plants.

The transfer of the propagated shoots of *H. dulcis* to a cytokinin-free MS medium induced stem elongation and rooting. Although cytokinins are known to regulate morphogenesis in plant tissue culture, stimulating shoot proliferation, their presence can inhibit the elongation process (Schaller et al. 2015). Our results corroborate previous studies with *H. dulcis* (Jeong et al. 2009) when shoots obtained by indirect organogenesis were elongated and rooting was performed on growth regulator-free medium. However, supplementation with auxins was necessary to induce these morphogenic responses in three other studies on the species (Echeverrigaray et al. 1998; Park et al. 2006; Yang et al. 2013), as well as species of the genus *Zizyphus* (Goyal and Arya 1985; Rathore et al. 1992; Mathur et al. 1995) from the Rhamnaceae family.

### Cryopreservation

Once the in vitro propagation of *H. dulcis* was established, the long-term conservation of shoot tips using the V

cryo-plate technique was investigated, resulting in the first work related to cryopreservation on the genus *Hovenia*. The in vitro conservation is an important complementary approach to conserve woody species, especially when considering its slow life cycle and the fact that many tree species have recalcitrant seeds, which makes them difficult to store in seed banks (Lambardi and Shaarawi 2016; Corredoira et al. 2017).

Shoot tips are the most used in vitro materials for woody plant cryopreservation. Shoot tips are composed of meristematic tissues, which are characterized by cells with small or absent vacuoles, thin walls, no intercellular space and cells dividing at a constant rate. The shoot tips show a high potential for osmotic tolerance, an important characteristic for success in the establishment of cryopreservation protocols (Normah et al. 2019). Shoot tip cryopreservation of wood species has been carried out by mainly applying vitrification-based techniques (Corredoira et al. 2017; Bettoni et al. 2019a; O'Brien et al. 2020). The V cryo-plate procedure used here to *H. dulcis* has a few applications in wood species, as reported in *Diospyros kaki* Thunb. (Matsumoto et al. 2015), *Prunus* spp. (Vujović et al. 2015), *Vitis* (Bettoni et al. 2019c) and *Morus* spp. (Tanaka et al. 2019). The use of this technique facilitates the handling of the material, making the procedures faster since the adhesion of the materials to the cryo-plates reduces the chance of mechanical injuries. Moreover, since the cryo-plates are made of aluminium, a metal with high heat conductivity, the procedures of cooling and rewarming are faster (Niino et al. 2019; Wang et al. 2020b).

Most vegetative explants subjected to cryopreservation contain high levels of free water in their cells and are, therefore, highly sensitive to damage caused by ice formation during the cooling process (Engelmann 2011a). Thus, the biological material is usually dehydrated to protect it from the damage caused by conversion of intracellular liquid water to ice (Corredoira et al. 2017). The first dehydration step applied to shoot tips of *H. dulcis* was preculture performed in a solidified MS medium with 0.3 M sucrose for 24 h. Sugars are involved in the mechanisms of plant resistance to desiccation and can, for example, replace the water in membranes or induce the process of intracellular vitrification at room temperature (Dumet et al. 1994; Benson 2008). Although sucrose is the most commonly used sugar in cryopreservation protocols, glucose, maltose, mannitol and sorbitol can also be used (Folgado et al. 2015).

After the adhesion of shoot tips to the cryo-plates, the material was submitted to an osmoprotection stage by immersion in a loading solution, which has high concentrations of sucrose (0.4M) and glycerol (2.0M), the function of which is to increase the tolerance of biological material to cryoprotective solutions (Nishizawa et al. 1993). Although several cryoprotective solutions have already been



established (Engelmann 2013), we selected PVS2 as the vitrification solution and used it at 0°C. PVS2 acts on some mechanisms that protect plant cells from injuries caused by cooling, replacing the cellular water and altering the cooling behavior of the water remaining in the cells, a process known as vitrification. Longer exposure periods to PVS2 are usually accompanied by an adjustment to the temperature at which the solution is used, owing to its high penetration and toxicity at room temperature (Menon et al. 2012).

For *H. dulcis*, dehydration with PVS2 for 120 min resulted in the maximal recovery rate (62%) of cryopreserved shoot tips. High exposure time to PVS2 used at 0 °C were also required for other woody species, such as *Carica papaya* L., which showed 90% recovery after 80 min of exposure to PVS2 (Tsai et al. 2009), *Ziziphus jujuba*, a species belonging to the Rhamnaceae family, that reached 75% recovery after 90 min of exposure to PVS2 (Wang et al. 2015) and for 12 *Vitis* species, that reached at least 43% recovery after 90 min of exposure to PVS2 (Bettoni et al. 2019b). On the other hand, for other woody species the most efficient cryopreservation protocols applied low exposure times to the vitrification solution. For *Araucaria angustifolia* the highest recovery rate (35%) was achieved after 15 min of immersion in PVS2 (Prudente et al. 2016). Exposure to PVS2 for 20–25 min was the most efficient procedure to recovery after cryopreservation to *Persea americana* Mill. (73%) (O'Brien et al. 2020) and *Garcinia mangostana* (50%) (Ibrahim and Normah 2013). These results demonstrated that the tolerance to dehydration with PVS2 varies among species, kind of explant, PVS2 temperature and according to differences in tissue water exchange properties. These characteristics are primary determinants of the osmotic dehydration rate (Vicente et al. 2012).

During the first month after cryopreservation, were observed in some shoot tips of *H. dulcis* characteristics of hyperhydricity and callogenesis like twisted and transparent leaf, and proliferation of a translucent mass of cells. These aspects are often characteristic, but not limited, to cultures maintained on media with high concentrations of cytokinins and have been reported in some plant materials recovering from cryogenic procedures (Mašlanka et al. 2013; Lynch et al. 2014; Kulus 2018; Kulus et al. 2018).

Because of the occurrence of hyperhydricity and callogenesis in cryopreserved shoot tips of *H. dulcis*, reduction in the concentration of cytokinins in the recovery medium was evaluated. However, the low concentration of BA and KIN (0.2 mg L<sup>-1</sup>) did not influence the occurrence of hyperhydric aspect and callogenesis after cryopreservation. In addition, lower rates of survival and recovery were obtained in this condition. In contrast, cryopreserved shoot tips of *Thymus moroderi* presented the highest regeneration rates and lowest level of hyperhydricity on medium supplemented with low BA concentration (0.06 mg L<sup>-1</sup>)

(Marco-Medina et al. 2010). Although the addition of BA to the recovery medium has shown benefits to recovery, the optimal BA concentration vary with the botanical material used, as well as with the cryogenic procedure (Wang et al. 2003).

Cryopreserved shoot tips of *H. dulcis* reached the highest recovery rates in the presence of cytokinins (BA and KIN) at 0.5 mg L<sup>-1</sup>. In this condition, the hyperhydric aspect and callogenesis disappeared along the subcultures, and the plants recovered a normal phenotypic aspect. Similarly, in cryopreserved nodal segments and shoot tips of *Cydonia oblonga*, some regenerated shoots appeared hyperhydrated, but subsequently exhibited a normal morphology within 4 weeks after rewarming (Lynch et al. 2014). Physiological disorders such as hyperhydricity are closely linked to stress processes related to cell membrane damages (Rojas-Martínez et al. 2010). During the cryopreservation steps, plant tissues are exposed to several stress conditions that can result in intracellular ice crystals formation, excessive desiccation, triggering apoptosis or even cause irreversible damage to tissues (Uchendu et al. 2010). However, as observed in *H. dulcis*, the normal phenotypic aspect after successive subcultures, suggests that the damages caused during cryopreservation has been properly repaired.

Rehydration of cryopreserved materials is a slow and gradual process, which initiates by exposing the material to the unloading solution, followed by the transfer to a recovery medium. The use of physical barriers, such as filter paper, allows water to slowly diffuse from the culture medium into the material, contributing to the restoration of normal water status and avoidance of possible injuries caused by rapid rehydration of the material (Reed 2008; Benson and Harding 2012; Normah et al. 2019). Several studies used filter paper during the recovery step, but they did not compare the effect of the presence/absence of this support. Filter paper is often used on top of the recovery medium of cryopreserved shoot tips (Mandal and Dixit-Sharma 2007; Antony et al. 2011; Pathirana et al. 2016; Mathew et al. 2018; Sulong et al. 2018), and it is also associated with the use of high sucrose concentration (Sant et al. 2008; Marco-Medina et al. 2010; Condello et al. 2011; Panis 2019; Vollmer et al. 2019) or with decreasing concentrations of sucrose in the medium (Panta et al. 2014). The cryopreserved shoot tips of *H. dulcis* cultivated in the presence of filter paper placed on top of the recovery medium showed higher recovery rates (62%) when compared to protocols without the use of this support (45%). The use of supports onto which the recovered tissue is suspended was also investigated by Ford et al. (2000) for cryopreserved embryogenic tissues of *Pinus patula*. The authors demonstrated that the use of supports improve the recovery rates, but a combination of filter paper and polyester grids performed better than the tissue recovering on filter paper alone.

The present study also evaluated the cryopreservation of shoot tips excised directly from axillary shoots of stock plants. In *H. dulcis*, some axillary buds show active growth and develop into axillary shoots on the stem on mother plants. This process may be stimulated by the presence of cytokinins in the culture medium of in vitro propagated plants. Cytokinins promote axillary shoot formation by opposing apical dominance regulated by auxins (Beyl 2000; Park et al. 2006). In the present study, axillary shoots were an alternative source of shoot tips and were compared with shoot tips excised from microcuttings.

Microcuttings cultured from the in vitro-grown stock plants made prior to the excision of shoot tips have been suggested to produce a large number of relatively homogeneous and adequate shoot tips in terms of size, physiological state and growth, increasing the chance of positive and uniform responses in cryogenic procedures (Charoensub et al. 2003; Kulus and Zalewska 2014; Wang et al. 2014a; Bettoni et al. 2019b; Kulus 2020). On the other hand, the use of axillary buds excised directly from the mother plants has also been proposed as a way of increasing the number of explants for cryopreservation (Halmagyi et al. 2005; Pathirana et al. 2016).

Shoot tips from *H. dulcis* microcuttings produced the highest recovery rates after cryopreservation, compared to shoot tips isolated directly from stock plants. Some studies have evaluated the differences between these two sources of shoot tip. Similar to *H. dulcis*, cryopreservation of shoot tips sampled from *Chrysanthemum morifolium* (Wang et al. 2014b) and *Vitis vinifera* (Marković et al. 2014) microcuttings showed higher regrowth compared with shoot tips excised directly from in vitro propagated plants. The authors highlight active microcutting growth and axillary buds under the effect of apical dominance in complete plants as important aspects for post-cryopreservation responses. Studies where explants derived from apical shoot tips and axillary buds are compared observed differences related to their physiological stages, metabolic profiles, and water content (Halmagyi et al. 2005; Lee et al. 2011; Pathirana et al. 2016).

The results obtained with *H. dulcis* in the present work confirm the observations reported in other studies and show the feasibility of both microcuttings and axillary shoots as source of shoot tips for cryopreservation. The use of microcuttings can provide more uniform material. The use of axillary buds can save time since the microcutting cultivation step is suppressed. Therefore, the choice of the most suitable explant source must be made for each species under study, taking into account the advantages that each explant source presents.

## Conclusions

The studies carried out with *H. dulcis* allowed the establishment of efficient protocols for in vitro propagation on medium supplemented with the cytokinins BA and KIN and the cryopreservation of the species applying the V Cryoplate technique. Considering the commercial interest in the family Rhamnaceae, this study may contribute to biotechnological research related to in vitro propagation and long-term conservation of other woody species of great commercial, medicinal and nutraceutical importance, especially those species belonging to the Rhamnaceae family.

**Acknowledgements** This study was supported by the Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education/CAPES (Finance Code 001), the Brazilian Council for Scientific and Technological Development/CNPq and The Carlos Chagas Filho Research Support Foundation/FAPERJ. The authors are grateful to Adriana M. Lanzio (TCT/FAPERJ) for lab assistance and illustrations of methodology and to Márcio M. Silva for valuable help with graphic design. Special thanks to Dr. Takao Niino (University of Tsukuba, Japan) for the supply of cryo-plates and Dr. Florent Engelmann (Institut de Recherche pour le Développement, France) for introducing the V Cryoplate methodology to our research group.

**Author contributions** AMS, TCC, LSC, NA, CSG conceived and planned the experiments. AMS, TCC, LSC, TA carried out the experiments. LSC, NA, CSG supervised the work. All authors contributed to the interpretation of the results, wrote, read and approved the manuscript.

**Funding** This research is grant aided by the Brazilian Council for Scientific and Technological Development/CNPq (Process 421,538/2016-3) and The Carlos Chagas Filho Research Support Foundation/FAPERJ (E-26/010.001631/2014 and E-26/010.001019/2016).

## References

- An C (2019) In Vitro propagation of commonly used medicinal trees in Korea. *J For Environ Sci* 35:272–280
- Antony JJJ, Keng CL, Rathinam X, Marimuthu S, Subramaniam S (2011) Effect of preculture and PVS2 incubation conditions followed by histological analysis in the cryopreserved PLBs of *Dendrobium Bobby Messina* orchid. *Aust J Crop Sci* 5:1557–1564
- Aros D, Vásquez M, Rivas C, Loreto M (2017) An efficient method for in vitro propagation of *Alstroemeria pallida* Graham rhizomes. *Chil J Agri Res* 77:95–99
- Benson EE (2008) Cryopreservation theory. In: Reed BM (ed) *Plant cryopreservation: a practical guide*. Springer, New York, pp 15–32
- Benson EE, Harding K (2012) Cryopreservation of shoot tips and meristems: an overview of contemporary methodologies. In: Loyola-Vargas VM, Ochoa-Alejo N (eds) *Plant cell culture protocols, methods in molecular biology*. Humana Press, Totowa, pp 191–226
- Bettoni JC, Souza JA, Volk GM, Dalla Costa M, da Silva FN, Kretschmar AA (2019a) Eradication of latent viruses from apple cultivar 'Mona Lisa' shoot tips using droplet-vitrification cryotherapy. *Sci Hortic* 250:12–18



- Sakai A, Kobayashi S, Oiyama I (1990) Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. *Plant Cell Rep* 9:30–33
- Sant R, Panis B, Taylor M, Tyagi A (2008) Cryopreservation of shoot-tips by droplet vitrification applicable to all taro (*Colocasia esculenta* var. *esculenta*) accessions. *Plant Cell Tiss Org Cult* 92:107–111
- Schaller EG, Bishopp A, Kiebert JJ (2015) The yin-yang of hormones: cytokinin and auxin interactions in plant development. *Plant Cell* 27:44–63
- Schmidt AD, Castellani TT, Dechoum MS (2020) Biotic and abiotic changes in subtropical seasonal deciduous forest associated with invasion by *Hovenia dulcis* Thunb. (Rhamnaceae). *Biol Invasions* 22:293–306
- Serafim CM, Campos AS, Melo PDS, Castro ACR, Carvalho A (2018) Types and concentrations of cytokinins in the micropropagation of *Anthurium maricense*. *Braz J Agrarian Environ Sci* 12:117–123
- Sulong N, Shahabudin NF, Noor NM (2018) Critical vitrification steps towards survival of *Garcinia hombroniana* (Clusiaceae) shoot tips after cryopreservation. *Rev Biol Trop* 66:1314–1323
- Tanaka D, Yamamoto S, Matsumoto T, Arizaga MV, Niino T (2019) Development of effective cryopreservation protocols using aluminium cryo-plates for mulberry. *Acta Hort* 1234:263–268
- Tsai SF, Yeh SD, Chan CF, Liaw SI (2009) High-efficiency vitrification protocols for cryopreservation of in vitro grown shoot tips of transgenic *papaya* lines. *Plant Cell Tiss Org Cult* 98:157–164
- Uchendu EE, Leonard SW, Traber MG, Reed BM (2010) Vitamins C and E improve regrowth and reduce lipid peroxidation of blackberry shoot tips following cryopreservation. *Plant Cell Rep* 29:25–35
- Vianna MG, Garcia RO, Mansur E, Engelmann F, Pacheco G (2019) Oxidative stress during the cryopreservation of *Passiflora suberosa* L. shoot tips using the V-Cryo-plate technique: determination of the critical stages of the protocol. *Plant Cell Tiss Org Cult* 139:369–379
- Vicente S, Nieto AB, Hodara K, Castro MA, Alzamora SM (2012) Changes in structure, rheology, and water mobility of apple tissue induced by osmotic dehydration with glucose or trehalose. *Food Bioprocess Tech* 5:3075–3089
- Vilardo AFRM, Mendonça TF, Engelmann F, Cordeiro LS, Albarello N, Simões-Gurgel C (2019) Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of the medicinal species *Cleome spinosa* (Cleomaceae) applying vitrification-based techniques. *CryoLetters* 40:237–246
- Volk GM, Jenderek M, Chen K (2020) Cryopreservation of dormant apple buds. In: Volk GM (Eds.) *Training in plant genetic resources: cryopreservation of clonal propagules*. Fort Collins, Colorado: Colorado State University. <https://colostate.pressbooks.pub/clonalcryopreservation/chapter/apple-dormant-bud-cryopreservation/>. Accessed 26 July 2020
- Vollmer R, Villagaray R, Castro M, Anglin NL, Ellis D (2019) Cryopreserved potato shoot tips showed genotype-specific response to sucrose concentration in rewarming solution (RS). *Plant Cell Tiss Org Cult* 136:353–363
- Vujović T, Chatelet P, Ružić D, Engelmann F (2015) Cryopreservation of *Prunus* spp. using aluminium cryo-plates. *Sci Hort* 195:173–182
- Wang Q, Li P, Batuman Ö, Gafny R, Mawassi M (2003) Effect of benzyladenine on recovery of cryopreserved shoot tips of grapevine and citrus cultured in vitro. *CryoLetters* 24:293–302
- Wang M, Zhu P, Jiang C, Ma L, Zhang Z, Zeng X (2012) Preliminary characterization, antioxidant activity in vitro and hepatoprotective effect on acute alcohol-induced liver injury in mice of polysaccharides from the peduncles of *Hovenia dulcis*. *Food Chem Toxicol* 50:2964–2970
- Wang B, Li J-W, Zhang Z-B, Wang R-R, Ma Y-L, Blystad D-R, Keller EJ, Wang Q-C (2014a) Three vitrification-based cryopreservation procedures cause different cryo-injuries to potato shoot tips while all maintain genetic integrity in regenerants. *J Biotechnol* 184:47–55
- Wang R-R, Gao X-X, Chen L, Huo L-Q, Lib M-F, Wang Q-C (2014b) Shoot recovery and genetic integrity of *Chrysanthemum morifolium* shoot tips following cryopreservation by droplet-vitrification. *Sci Hort* 176:330–339
- Wang RR, Mou HQ, Gao XX, Chen L, Li MF, Wang QC (2015) Cryopreservation for eradication of Jujube witches' broom phytoplasma from Chinese jujube (*Ziziphus jujuba*). *Ann Appl Biol* 166:218–228
- Wang M-R, Hamborg Z, Slimestad R, Elameen A, Blystad DR, Haugslie S, Wang Q-C (2020a) Assessments of rooting, vegetative growth, bulb production, genetic integrity and biochemical compounds in cryopreserved plants of shallot. *Plant Cell Tiss Organ Cult*. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01820-7>
- Wang M-R, Lambardi M, Engelmann F, Pathirana R, Panis B, Volk GM, Wang Q-C (2020b) Advances in cryopreservation of in vitro-derived propagules: technologies and explant sources. *Plant Cell Tiss Organ Cult*. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01770-0>
- Yamamoto SI, Rafique T, Priyantha WS, Fukui K, Matsumoto T, Niino T (2011) Development of a cryopreservation procedure using aluminium Cryo-Plates. *CryoLetters* 32:256–265
- Yamamoto S-i, Fukui K, Rafique T, Khan NI, Castillo Martinez CR, Sekizawa K, Matsumoto T, Niino T (2012) Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of strawberry by the vitrification method using aluminium cryo-plates. *Plant Gen Res* 10:14–19
- Yang J, Wu S, Li C (2013) High efficiency secondary somatic embryogenesis in *Hovenia dulcis* Thunb. through solid and liquid cultures. *Sci World J* 2013:718754
- Yuniastuti E, Wardani NC, Nandariyah (2016) The effect of explant type and 6-benzyl adenine (BAP) in sapidilla (*Achras zapota*) micropropagation. *Am J Biochem Biotechnol* 12:206–213
- Zayova E, Vassilevska-Ivanova R, Kraptchev B, Stoeva D (2010) Somaclonal variations through indirect organogenesis in eggplant (*Solanum melongena* L.). *Biol Divers Conserv* 3:1–5

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

- Bettoni JC, Kretschmar AA, Bonnart R, Shepherd A, Volk GM (2019b) Cryopreservation of 12 *Vitis* species using apical shoot tips derived from plants grown in vitro. *HortScience* 54:976–981
- Bettoni JC, Bonnart R, Shepherd AN, Kretschmar AA, Volk GM (2019c) Modifications to a *Vitis* shoot tip cryopreservation procedure: effect of shoot tip size and use of cryoplates. *Cryoletters* 40:103–112
- Beyl CA (2000) Getting started with tissue culture—media preparation, sterile technique, and laboratory equipment. In: Trigiano RN, Gray DJ (eds) *Plant tissue culture concepts and laboratory exercises*, 2nd edn. CRC Press, Boca Raton, pp 21–38
- Bonga JM, Klimaszewska KK, Von Aderkas P (2010) Recalcitrance in clonal propagation, in particular of conifers. *Plant Cell Tiss Org Cult* 100:241–254
- Castro TC, Pelliccione VLB, Figueiredo MR, Soares RODA, Bozza MT, Viana VRC, Albarello N, Figueiredo SLF (2002) Atividade antineoplásica e tripanocida de *Hovenia dulcis* Thunb. cultivada in vivo e in vitro. *Braz J Pharmacog* 12:96–99
- Castro TC, Barbosa KC, Albarello N, Figueiredo SLF (2005) Characterization of pseudofruits, fruits, seeds and plantules obtained from in vivo and in vitro germination of *Hovenia dulcis* (Rhamnaceae) medicinal species. *Rev Cubana Plant Med* 10:1–17
- Castro TC, Simões-Gurgel C, Ribeiro IG, Coelho MGP, Albarello N (2014) Morphological aspects of fruits, seeds, seedlings and in vivo and in vitro germination of species of the genus *Cleome*. *J Seed Sci* 36:326–335
- Charoensub R, Phansiri S, Yongmanitchai W, Sakai A (2003) Routine cryopreservation of in vitro-grown axillary apices of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) by vitrification: importance of a simple monodonal culture. *Sci Hortic* 98:485–492
- Condello E, Caboni E, André E, Piette B, Druart P, Swennen R, Panis B (2011) Cryopreservation of apple in vitro axillary buds using droplet-vitrification. *CryoLetters* 32:175–185
- Cordeiro LS, Simões-Gurgel C, Albarello N, Engelmann F (2015) Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of *Cleome rosea* Vahl (Cleomaceae) using the V Cryo-Plate technique. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 51:688–695
- Cordeiro LS, Simões-Gurgel C, Albarello N, Engelmann F (2017) Cleomaceae (*Cleome rosea* Vahl ex DC.), shoot tips, V-cryoplate method. In: Niino T, Matsumoto T, Yamamoto S-I, Maki S, Tanaka D, Engelmann F (eds) *Manual of cryopreservation methods using cryo-plate*, 1st edn, vol 1. *Plant Tissue Culture and Cryopreservation Group (PTTCryoG)*, Jalisco, pp 62–63
- Corredoira E, Martínez MT, Sanjosé MC, Ballester A (2017) Conservation of hardwood forest species. In: Ahuja MR, Jain SM (eds) *Biodiversity and conservation of woody plants, sustainable development and biodiversity*, 1st edn. Springer, Cham, pp 421–453
- Dar RA, Shah Nawaz M, Qazi PH (2017) Natural product medicines: a literature update. *J Phytopharmacol* 6:340–342
- Dias DA, Urban S, Roessner U (2012) A historical overview of natural products in drug discovery. *Metabolites* 2:303–336
- Dumet D, Engelmann F, Chabrilange N, Dussert S, Duval Y (1994) Effect of various sugars and polyols on the tolerance to desiccation and freezing of oil palm polyembryonic cultures. *Seed Sci Res* 4:307–313
- Echeverrigaray S, Mossi AJ, Munari F (1998) Micropropagation of raisin tree (*Hovenia dulcis* Thunb.) through axillary bud culture. *J Plant Biochem Biot* 7:99–102
- Engelmann F (2011a) Cryopreservation of embryos: an overview. In: Thorpe TA, Yeung EC (eds) *Plant embryo culture. Methods in molecular biology (methods and protocols)*, vol 710. Humana Press, Totowa, pp 155–184
- Engelmann F (2011b) Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 47:5–16
- Engelmann F (2013) Cryopreservation of clonal crops: a review of key parameters. II *Int Symp Plant Cryopreserv* 1039:31–39
- Espinosa-Leal CA, Puente-Garza CA, García-Lara S (2018) In vitro plant tissue culture: means for production of biological active compounds. *Planta* 248:1–18
- Folgado R, Panis B, Sergeant K, Renaut J, Swennen R, Hausman JF (2015) Unravelling the effect of sucrose and cold pretreatment on cryopreservation of potato through sugar analysis and proteomics. *Cryobiology* 71:432–441
- Ford CS, Jones NB, Van Staden J (2000) Optimization of a working cryopreservation protocol for *Pinus patula* embryogenic tissue. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 36:366–369
- Gadelha APR, Vidal F, Castro TC, Lopes CS, Albarello N, Coelho MGP, Figueiredo SLF, Monteiro-Leal LH (2005) In vitro susceptibility of *Giardia lamblia* to *Hovenia dulcis* extracts. *Parasitol Res* 97:399–407
- George EF, Hall MA, De Klerk G-J (2008) *Plant propagation by tissue culture*. Springer, Dordrecht, 501p
- González-Arno MT, Dolce N, González-Benito ME, Castillo Martínez CR, Cruz-Cruz CA (2017) Approaches for in vitro conservation of woody plants germplasm. In: Ahuja M, Jain S (eds) *Biodiversity and conservation of woody plants. Sustainable development and biodiversity*, vol 17. Springer, Cham, pp 355–419
- Goyal Y, Arya HC (1985) Tissue culture of desert trees: II. Clonal multiplication of *Zizyphus* in vitro. *J Plant Physiol* 119:399–404
- Groover A (2017) *Age-related changes in tree growth and physiology*. eLS. Wiley, Chichester, pp 1–7
- Guidini CC, Pinto-Maglio CAF, Lombello RA (2017) Karyotype, rDNA localization and meiotic behavior of *Hovenia dulcis* Thunb. (Rhamnaceae). *Caryologia* 70:385–389
- Halmagyi A, Deliu C, Coste A (2005) Plant regrowth from potato shoot tips cryopreserved by a combined vitrification-droplet method. *CryoLetters* 26:313–322
- Hendges CD, Fortes VB, Dechoum MS (2012) Consumption of the invasive alien species *Hovenia dulcis* Thunb. (Rhamnaceae) by *Sapajus nigritus* Kerr, 1792 in a protected area in southern Brazil. *Rev Bras Zool* 14:255–260
- Ibrahim S, Normah MN (2013) The survival of in vitro shoot tips of *Garcinia mangostana* L. after cryopreservation by vitrification. *Plant Growth Regul* 70:237–246
- Jeong MJ, Song HJ, Park DJ, Min JY, Jo JS, Kim BM, Choi MS (2009) High frequency plant regeneration following abnormal shoot organogenesis in the medicinal tree *Hovenia dulcis*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 98:59–65
- Kaczmarczyk A, Rokka VM, Keller EJ (2011) Potato shoot tip cryopreservation. A review. *Potato Res* 54:45–79
- Kulus D (2018) Effects of various preculture, pretreatment, and recovery conditions on the morphogenetic response of cryopreserved Lady Orange chrysanthemum shoot tips. *Turk J Biol* 42:76–86
- Kulus D (2020) Shoot tip cryopreservation of *Lamprocapnos spectabilis* (L.) Fukuhara using different approaches and evaluation of stability on the molecular, biochemical, and plant architecture levels. *Int J Mol Sci* 21:3901
- Kulus D, Zalewska M (2014) Cryopreservation as a tool used in long-term storage of ornamental species—a review. *Sci Hortic* 168:88–107
- Kulus D, Serocka M, Mikula A (2018) Effect of various preculture and osmotic dehydration conditions on cryopreservation efficiency and morphogenetic response of chrysanthemum shoot tips. *Acta Sci Pol Hort Cult* 17:139–147
- Kulus D, Muhire JD, Aksoy B (2020) Growth regulation and validation of homogeneity in in vitro-derived bleeding heart by molecular markers and spectral analysis of pigments. *J Plant Growth Reg.* <https://doi.org/10.1007/s00344-020-10204-2>