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

Anna Flávia Rodrigues Mortani Vilardo

Criopreservação de plantas propagadas *in vitro* de *Cleome spinosa* Jacq. (Cleomaceae)

Rio de Janeiro
2015

Anna Flávia Rodrigues Mortani Vilardo

Criopreservação de plantas propagadas *in vitro* de *Cleome spinosa* Jacq. (Cleomaceae)

Dissertação apresentada, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Biotecnologia Vegetal.

Orientadora: Prof.ª Dra. Cláudia Simões Gurgel

Coorientadora: Prof.ª Dra. Norma Albarello

Rio de Janeiro

2015

CATALOGAÇÃO NA FONTE

UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CTC-A

V697

Vilardo, Anna Flavia Rodrigues Mortani.
Criopreservação de plantas propagadas *in vitro* de *Cleome spinosa* Jacq. (Cleomaceae) / Anna Flávia Rodrigues Mortani Vilardo. – 2015.
95f. : il.

Orientadoras: Cláudia Simões Gurgel, Norma Albarello.
Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes.
Inclui bibliografia.

1. Plantas medicinais - Criopreservação - Teses. 2. Plantas - Propagação in vitro – Teses. 3. Tecidos vegetais - Cultura e meios de cultura - Teses. I. Gurgel, Cláudia Simões. II. Albarello, Norma. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes. IV. Título.

CDU 633.8

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

_____ _____

Assinatura Data

Anna Flávia Rodrigues Mortani Vilardo

Criopreservação de plantas propagadas *in vitro* de *Cleome spinosa* Jacq. (Cleomaceae)

Dissertação apresentada, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Biotecnologia Vegetal.

Aprovado em 30 de abril 2015.

Orientadoras:

Prof.ª Dra. Cláudia Simões Gurgel

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Profª. Dra. Norma Albarello

Instituto de Biologia Alcântara Gomes - UERJ

Banca Examinadora:

_____

Profª. Dra. Georgia Pacheco Peters de Almeida

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

_____

Profª. Dra. Alice Sato

Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

_____

Profª. Dra. Nina Claudia Barboza da Silva

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2015

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, João e Andréa, pelo amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Cláudia Simões Gurgel pelos ensinamentos, dedicação inquestionável, “puxões de orelha” e palavras de incentivo ao longo desses dois anos. Agradeço também à minha co-orientadora Norma Albarello que, em meio a tantas atribuições, sempre se mostrou disposta a ajudar no que fosse necessário. Vocês são muito mais do que orientadoras, são exemplos profissionais e pessoais. Obrigada por acreditarem em mim!

Ao Pesquisador Florent Engelmann pelos ensinamentos, críticas e sugestões que foram de fundamental importância para a realização deste trabalho.

A toda equipe do Laboratório de Biotecnologia de Plantas (LABPLAN) pelo intercâmbio de informações, auxílio nas rotinas laboratoriais e agradável convívio.

À aluna de doutorado do PGBV, Lívia Cordeiro, por me ensinar as técnicas de criopreservação e por toda ajuda ao longo desses anos!

À estagiária Thaís Oggi por todo o auxílio na realização dos experimentos! Obrigada pelo carinho e dedicação!

À bolsista Adriana Lanziotti por todo o apoio dado durante os experimentos e pelas ilustrações. Obrigada!

Aos amigos Bruna Bantin, Christine Lourenço, Flávia Cabral, Gabriela Fernandes, Lauana Coimbra, Thaís Tanini e Victor Barreto pela compreensão, desabafos e momentos alegres. Vocês tornaram o meu caminho mais leve e descontraído. Obrigada por estarem sempre torcendo por mim!

A toda minha família por entender minha ausência quando necessário, pelos momentos felizes e de união compartilhados. Em especial aos meus avós, Catharina, Annina e Benito, pelo exemplo de amor e fé, sempre presentes em minha vida.

Ao meu noivo, Bruno Bantim, por ser tão importante na minha vida! Obrigada por estar sempre ao meu lado, me ouvindo, encorajando e alegrando nos momentos mais difíceis!

Aos meus pais por terem me dado o bem mais precioso e ensinado os valores que carrego comigo. Obrigada por estarem sempre ao meu lado, me incentivando e nunca medindo esforços para me apoiar.

Descobrir consiste em olhar para o que todo mundo está vendo e pensar uma coisa diferente.

Roger Von Oech

RESUMO

VILARDO, A. F. R. M. *Criopreservação de plantas propagadas in vitro de Cleome spinosa Jacq.* (Cleomaceae). 2015. 95f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

Cleome spinosa é uma espécie utilizada na medicina tradicional e também com fins ornamentais. A espécie vem sendo investigada sob o ponto de vista biotecnológico, já tendo sido estabelecidos diferentes sistemas *in vitro* por técnicas de cultura de tecidos. Entretanto, a manutenção *in vitro* em condições de crescimento ativo apresenta riscos, como a ocorrência de contaminações e variações somaclonais. A criopreservação, que trata da manutenção do material biológico em baixas temperaturas pela imersão em nitrogênio líquido, representa um eficiente sistema de conservação em longo prazo, permitindo a manutenção do germoplasma vegetal por períodos de tempo indeterminados. O presente trabalho teve como objetivo definir protocolos de criopreservação pelas técnicas de vitrificação e v-crioplacas para plantas cultivadas *in vitro* da espécie *C. spinosa.* Explantes de diferentes regiões (ápices caulinares, segmentos nodais e internodais) foram avaliados quanto à sua capacidade de regeneração a partir de fragmentos de tamanho reduzido. Para a criopreservação, foi avaliado o pré-cultivo do material por 24 horas em meio contendo 0,3 M de sacarose ou em concentrações crescentes de sacarose (0,25 M - 0,50 M), por 48 horas. A seguir, o material foi exposto à solução de *loading* e às soluções de vitrificação PVS2 (25°C e 0°C) e PVS3 (25°C) por diferentes tempos (15; 30; 45; 60; 90; 120 min). Para a etapa de reaquecimento na técnica de vitrificação, o material foi imerso em banho-maria, enquanto que na técnica de V-Crioplacas o processo ocorreu diretamente através da imersão das crioplacas na solução de alta osmolaridade (*unloading*). Explantes não resfriados e os criopreservados foram transferidos para solução *unloading* e inoculados em meio de recuperação (MS + 0,5 $mg.L^{-1}$ de BAP), sendo mantidos no escuro por 24 horas, seguido de transferência gradual para luz. Após 30 dias, o material foi transferido para meio MS0 para o acompanhamento da recuperação. A regeneração de ápices caulinares ocorreu a partir de fragmentos de pequeno tamanho (1,5 mm) os quais foram selecionados para os estudos de criopreservação. Não foram observadas diferenças nas taxas de recuperação dos ápices em relação aos dois protocolos de pré-cultivo testados, quando as soluções de vitrificação foram usadas a 25°C. Porém, a aplicação de PVS2 a 0°C aumentou a taxa de recuperação para ápices pré-tratados com progressivo aumento da concentração de sacarose. Quanto ao tempo de exposição às soluções crioprotetoras, protocolos com PVS2 a 25°C foram mais eficazes em menores tempos de exposição, quando comparados àqueles estabelecidos com o uso da solução a 0°C. Para o PVS3, a determinação do melhor tempo de exposição teve relação direta com a técnica empregada, sendo tempos intermediários mais adequados na vitrificação e altos tempos mais eficientes para V-crioplacas. A técnica de V-crioplacas foi a mais eficaz para a criopreservação, sobretudo com a solução PVS2 a 0°C. Ápices criopreservados por esta técnica, submetidos ao pré-cultivo com aumento progressivo da concentração de sacarose e expostos ao PVS2 (0°C - 90 min), alcançaram taxas de recuperação de 70%. As

plantas recuperadas apresentaram aspecto fenotípico normal e mantiveram sua capacidade de regeneração ao longo do tempo em cultivo.

Palavras-chave: Ápices caulinares. PVS2. PVS3. Sacarose. Vitrificação.

ABSTRACT

VILARDO, A. F. R. M. Cryopreservation of *in vitro* propagated plants of *Cleome spinosa* Jacq. (Cleomaceae). 2015. 95f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

Cleome spinosa is used in folk medicine and as garden plant. This species has been investigated by biotechnological strategies, which has resulted in the establishment of different *in vitro* systems by tissue culture techniques. However, long-term maintenance of *in vitro* cultures in active growth conditions show risks, as contamination and somaclonal variations. Cryopreservation, the storage of biological material at ultra-low temperature, is an efficient long-term conservation system, allowing the maintenance of plant germplasm for indefinite periods of time. This study aimed to establish cryopreservation protocols for *in vitro* plants of *C. spinosa* using vitrification and v-cryo-plate techniques. Explants from different regions were evaluated for their ability to regenerate from small-sized fragments. For preculture, the material was maintained for 24 hours in a medium containing 0.3 M sucrose or increasing concentrations of suc. (0.25 M - 0.50 M), remaining at each concentration for 24 hours. Then, the material was exposed to loading solution and to the vitrification solutions PVS2 (25°C and 0°C) and PVS3 (25°C) for different exposure times (15, 30, 45, 60, 90, 120 min). To rewarming, the material cryopreserved by the Vitrification technique was immersed in a water bath, while in the V-Cryo-plate technique the process was direct by immersing the cryo-plates in a high osmolarity solution (unloading). Unfrozen and cryopreserved explants were transferred to unloading solution and were inoculated in regrowth medium (MS + 0.5 $mg.L^{-1}$ BAP). During regrowth the material was kept in darkness for 24 hours and followed by gradual transfer to light. After 30 days, the material was transferred to MS0 to evaluate the recovery rates. Shoot tips showed the best regeneration capacity from small fragments and were selected for cryopreservation studies. The preculture protocols showed no recovery differences in the presence of the vitrification solutions at 25°C. However, in the presence of PVS2 at 0°C, higher recovery values were reached by cryopreserved shoot tips pre-treated with a progressive increase in sucrose concentration. PVS2-based protocols with lower exposure times were more effective for cryopreservation at 25°C when compared to protocols at 0°C. To PVS3-based protocols intermediates exposure times were more efficient in the vitrification technique, while higher recovery rates were achieved in the V-Cryo-plate technique after longer exposure times. The V-Crio-plate was the most effective technique for shoot tips cryopreservation in *C. spinosa*, mainly when it was used in association with the PVS2 at 0°C. Shoot tips pre-treated with a progressive increase in sucrose concentration and exposed to PVS2 (0°C) for 90 minutes, using the V-Cryo-plate technique, reached 70% recovery rates. The regenerated plants showed normal phenotypic aspect and maintained their regenerative capacity over time in culture.

Keywords: PVS2. PVS3. Shoot tips. Sucrose, V-cryo-plate technique. Vitrification technique

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1	Composição de diferentes soluções de vitrificação.....	26
Figura 1	Representação filogenética dos clados Brassicaceae, Cleomaceae e Capparaceae com base em dados moleculares.....	28
Figura 2	Locais de ocorrência de *C. spinosa*.....	29
Figura 3	*Cleome spinosa*.....	31
Figura 4	Aspectos morfológicos de *C. spinosa*.....	31
Figura 5	Estudos biotecnológicos realizados no Laboratório de Biotecnologia de Plantas (LABPLAN/UERJ) com a espécie *C. spinosa*.....	35
Figura 6	Ápices caulinares de *C. spinosa* para criopreservação.....	38
Figura 7	Esquema da metodologia utilizada para os experimentos de vitrificação.....	40
Figura 8	Esquema da metodologia utilizada para os experimentos de v-crioplacas.....	42
Figura 9	Plantas regeneradas a partir de ápices caulinares e segmentos nodais de *C. spinosa,* após um mês de cultivo *in vitro*.....	45
Figura 10	Ápices caulinares de *C. spinosa* após tratamento por 24 horas em meio MS0 enriquecido com 0,3 M de sacarose.....	47
Figura 11	Efeito das etapas de pré-cultivo e exposição ao *loading* na recuperação de ápices caulinares de *C. spinosa* antes da imersão em NL.....	48
Figura 12	Ápices caulinares de *C. spinosa* pré-cultivados com 0,3 M de sacarose e criopreservados através da técnica de vitrificação com exposição a PVS2 (25ºC) por 30 minutos antes da imersão em NL.....	51
Figura 13	Ápices caulinares de *C. spinosa* pré-cultivados com 0,25 M - 0,5 M de sacarose e expostos à PVS2 (25 °C) por 15 min antes da imersão em NL.....	53
Figura 14	Resposta morfogênica de ápices caulinares de *C. spinosa* criopreservados pela técnica de vitrificação após 21 dias da exposição à PVS2 a 0°C.....	54

Figura 15 Resposta morfogênica em ápices caulinares de *C. spinosa* pré-cultivados com 0,3 M de sacarose e criopreservados pela técnica de vitrificação com exposição à PVS3..... 57

Figura 16 Resposta morfogênica de ápices caulinares de *C. spinosa* pré-cultivados com 0,25 M - 0,5 M de sacarose e criopreservados pela técnica de v-crioplacas, após 30 dias de exposição à solução PVS2 a 0°C..... 62

Figura 17 Plantas regeneradas a partir de ápices caulinares pré-cultivados com 0,25 M - 0,5 M de sacarose e criopreservados pela técnica de v-crioplacas, após 60 dias de exposição à PVS2 a 0°C..... 65

Figura 18 Plantas regeneradas a partir de ápices caulinares pré-cultivados com com 0,25 M - 0,5 M de sacarose e criopreservados pela técnica de v-crioplacas com exposição à PVS2 a 0°C por 90 minutos, após seis meses de cultivo *in vitro*..... 66

Figura 19 Plantas regeneradas a partir de ápices caulinares pré-cultivados com 0,25 M - 0,5 M de sacarose e criopreservados pela técnica de v-crioplacas com exposição à PVS3 por 90 minutos, após três meses de cultivo *in vitro*..... 69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Taxa de regeneração e número médio de brotos formados a partir de ápices caulinares e segmentos nodais de *C. spinosa*, após 30 dias em cultivo..... 45

Tabela 2 Teor hídrico e taxa de regeneração de ápices caulinares de *C. spinosa* cultivados em meio MS0 contendo diferentes concentrações de sacarose..... 47

Tabela 3 Criopreservação de ápices caulinares de *C. spinosa* através da técnica de vitrificação utilizando a solução crioprotetora PVS2 a 25°C..... 49

Tabela 4 Criopreservação de ápices caulinares de *C. spinosa* através da técnica de vitrificação utilizando a solução crioprotetora PVS2 a 0°C..... 50

Tabela 5 Número médio de brotos formados após a criopreservação de ápices caulinares de *C. spinosa* utilizando a técnica de vitrificação com PVS2..... 52

Tabela 6 Criopreservação de ápices caulinares de *C. spinosa* através da técnica de vitrificação utilizando a solução crioprotetora PVS3 a 25°C..... 55

Tabela 7 Número médio de brotos formados após a criopreservação de ápices caulinares de *C. spinosa* utilizando a técnica de vitrificação com PVS3..... 56

Tabela 8 Criopreservação de ápices caulinares de *C. spinosa* através da técnica de vitrificação em crioplacas (v-crioplacas) utilizando a solução crioprotetora PVS2 a 25°C..... 59

Tabela 9 Criopreservação de ápices caulinares de *C. spinosa* através da técnica de vitrificação em crioplacas (v-crioplacas) utilizando a solução crioprotetora PVS2 a 0°C..... 61

Tabela 10 Número médio de brotos formados após a criopreservação de ápices caulinares de *C. spinosa* utilizando a técnica de v-crioplacas com PVS2..... 64

Tabela 11 Criopreservação de ápices caulinares de *C. spinosa* através da técnica de vitrificação em crioplacas (v-crioplacas) utilizando a solução crioprotetora PVS3..... 67

Tabela 12 Número médio de brotos formados após a criopreservação de ápices caulinares de *C. spinosa* utilizando a técnica de v-crioplacas com PVS3..... 68

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
AIB	Ácido indolbutírico
ANA	Ácido naftalenoacético
BAP	6-benzilaminopurina
DMSO	Dimetil sulfóxido
EG	Etilenoglicol
KIN	6-furfurilamino-purina
MS	Meio de cultura de Murashige & Skoog (1962)
MS0	Meio de cultura de Murashige & Skoog (1962) sem reguladores de crescimento
NL	Nitrogênio líquido
PIC	Ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico
PVS	*Plant Vitrification Solution*
PVS2	*Plant Vitrification Solution 2*
PVS3	*Plant Vitrification Solution 3*
VSL	*Vitrification Solution L*

SUMÁRIO

CONSIDERAÇÕES INICIAIS..... 15

1 **INTRODUÇÃO**..... 16

1.1 **Estratégias de conservação**..... 17

1.1.1 Conservação *in vitro*..... 18

1.1.1.1 Cultura de Tecidos Vegetais..... 18

1.1.1.2 Criopreservação..... 23

1.2 ***Cleome spinosa* Jacq**..... 27

2 **OBJETIVOS**..... 36

2.1 **Objetivo geral**..... 36

2.2 **Objetivos específicos**..... 36

3 **METODOLOGIA**..... 37

3.1 **Material botânico e condições de cultura**..... 37

3.2 **Seleção de explantes**..... 37

3.3 **Criopreservação**..... 39

3.3.1 Pré-cultura..... 39

3.3.2 Vitrificação..... 39

3.3.3 V-Crioplaca..... 41

3.3.4 Reaquecimento recuperação..... 42

3.4 **Análise estatística**..... 43

4 **RESULTADOS**..... 44

4.1 **Seleção dos explantes**..... 44

4.2 **Pré-cultivo e *Loading***..... 46

4.3 **Vitrificação**..... 48

4.3.1 Tratamentos com PVS2..... 48

4.3.2 Tratamentos com PVS3..... 55

4.4 **V-Crioplacas**..... 58

4.4.1 Tratamentos com PVS2..... 58

4.4.2 Tratamentos com PVS3..... 66

5 **DISCUSSÃO**..... 70

CONCLUSÕES..... 82

REFERÊNCIAS..... 84

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

O presente trabalho integra o projeto "**Development of cryopreservation techniques for long-term conservation of medicinal plants occurring in the state of Rio de Janeiro - Brazil**", desenvolvido no âmbito do Programa Ciências sem Fronteiras (CNPq e Capes), em colaboração internacional da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ) com o Institut de Recherche pour le Développement (IRD), UMR DIADE, Montpellier, França. O projeto está sendo executado no Núcleo de Biotecnologia Vegetal da UERJ (NBV/UERJ) e conta com a colaboração direta do Dr. Florent Engelmann, Diretor do IRD e referência mundial no tema Criopreservação Vegetal. O referido pesquisador tem atuado como Pesquisador Visitante Especial (PVE), contribuindo na execução das diferentes linhas de pesquisa em criopreservação que se encontram em andamento nos diferentes laboratórios do NBV/UERJ.

Os estudos que constituem a presente Dissertação de Mestrado se referem à linha de pesquisa desenvolvida com *Cleome spinosa*, espécie utilizada na medicina popular e que tem sido investigada por técnicas biotecnológicas no NBV/UERJ desde 2001. Até o momento, não existem estudos das técnicas aqui propostas para esta espécie.

1 **INTRODUÇÃO**

Por vários séculos, as plantas têm sido reconhecidas como uma importante fonte de substâncias bioativas de interesse medicinal (BEVILACQUA, 2010; FRANÇA, 2004). O uso de plantas para fins terapêuticos remonta à origem das civilizações humanas, porém essa prática ainda é muito utilizada como forma de tratamento (BEVILACQUA, 2010).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 80% da população de alguns países da África e Ásia, fazem uso da fitoterapia como primeira opção de tratamento, sendo o único recurso terapêutico acessível para tratar enfermidades. No caso de países em desenvolvimento, estima-se que de 65 a 80% da população utiliza esse tipo de terapia como alternativa à medicina tradicional, principalmente, devido às heranças histórico-culturais e ao seu fácil acesso (AGRA et al., 2008; OMS, 2008).

Ao longo dos tempos, o conhecimento etnobotânico associado aos estudos bioquímicos e farmacológicos tem servido como base para o desenvolvimento de diversos biofármacos (MARASCHIN; VERPOORTE, 1999). Cerca de um quarto das substâncias bioativas presentes em formulações farmacêuticas comercializadas é baseado em substâncias derivadas do metabolismo secundário ou especial de plantas (SANTOS, 2004).

Diferentemente do metabolismo primário, o metabolismo secundário não está diretamente relacionado à produção de moléculas essenciais ao crescimento e desenvolvimento do vegetal, mas sim à síntese de substâncias que se relacionam com a sua adaptação ao ambiente em resposta ao estresse. Dessa forma, os metabólitos secundários são moléculas complexas, encontradas em pequenas quantidades (aproximadamente 1%) e restritas a certos grupos taxonômicos. Muitas dessas moléculas já foram isoladas, identificadas e tiveram a sua síntese associada a diversos fatores: (1) defesa contra patógenos, apresentando ações antibióticas, antifúngicas e antivirais; (2) proteção contra a herbivoria, através da síntese e acúmulo de substâncias impalatáveis; (3) alelopatia, influenciando no crescimento e desenvolvimento de sistemas biológicos; (4) proteção contra a radiação solar através da absorção do excesso de energia, evitando a foto-oxidação (BOURGAUD, 2001).

Para a produção de fármacos, a substância de interesse pode ser extraída diretamente da espécie ou ser sintetizada a partir de precursores da via metabólica. Entretanto, na maioria das vezes, a síntese química é limitada devido a complexidade das moléculas, de modo que a exploração comercial resulta em um intenso extrativismo (BOURGAUD, 2001). Esse processo, quando associado ao crescimento lento de algumas espécies, contribui para a erosão genética e, consequentemente, para a perda de genótipos produtores de substâncias bioativas.

Tendo em vista o crescimento do uso de produtos farmacêuticos contendo extratos vegetais e os elevados índices de erosão genética, diversas metodologias visando à conservação da biodiversidade vêm sendo empregadas.

1.1 **Estratégias de conservação**

Os ecossistemas brasileiros constituem uma fonte significativa de recursos genéticos (MMA, 2000). Entretanto, o aumento da população humana nas últimas décadas vem intensificando a degradação do patrimônio genético devido ao processo de urbanização, ao desmatamento, à poluição, à exploração predatória de espécies endêmicas, contribuindo para a perda indireta da biodiversidade (RAO, 2004). A fim de proteger a diversidade e evitar a perda de valiosos recursos genéticos, diversos programas que visam à conservação de germoplasma vêm sendo implementados (VIEIRA, 2000).

A estratégia de conservação da biodiversidade envolve os métodos *in situ* e *ex situ.* A conservação *in situ* compreende a manutenção e recuperação de populações viáveis de espécies em seu *habitat* natural (MMA, 2000; RAO, 2004). Por estar pautada na conservação do ecossistema natural, a conservação *in situ* inclui áreas selvagens, sistemas agrícolas tradicionais e a criação e monitoramento de extensas áreas, as Unidades de Conservação (BRASIL, 2000; HASSLER, 2005). Entretanto, ainda há uma carência de órgãos governamentais e institucionais que assegurem o uso e manejo adequado das áreas para que as metas possam ser atingidas (HEYWOOD; DULLOO, 2005). Além disso, a conservação de uma espécie em um ou poucos locais de ocorrência não significa, necessariamente, a conservação de toda a sua variabilidade genética (MMA, 2000).

Como estratégia complementar à conservação *in situ*, destaca-se a conservação *ex situ* que envolve a manutenção do germoplasma vegetal fora do *habitat* natural (IUCN, 2002; MMA, 2000). A conservação *ex situ* possibilita a reunião de materiais genéticos de procedências distintas em apenas um local, facilitando o melhoramento genético, garantindo a proteção à diversidade intraespecífica e tendo a possibilidade de se preservar genótipos de interesse. Porém, essas metodologias dependem da contínua manutenção do homem, tornando a coleção bastante vulnerável (MMA, 2000). Dentre as estratégias mais comuns de conservação *ex situ* estão os bancos de sementes, as coleções de campo e os sistemas de conservação *in vitro* (JUNGHANS; SOUZA, 2009).

Nos bancos de sementes, o material é submetido à desidratação e posterior armazenamento em baixas temperaturas, por longos períodos (VIEIRA et al., 2008). A manutenção da viabilidade das sementes no armazenamento depende do conhecimento do seu comportamento durante o processo. Com base na suscetibilidade à dessecação e tolerância a baixas temperaturas, as sementes podem ser classificadas em ortodoxas, intermediárias ou recalcitrantes (ELLIS, 1991).

Sementes ortodoxas podem ser dessecadas a teores de umidade entre 2% e 6% e armazenadas a temperaturas abaixo de 0°C, mantendo-se viáveis por longos períodos (HONG; LININGTON; ELLIS, 1996; MEDEIROS; EIRA, 2006). As sementes que apresentam comportamento intermediário toleram uma redução parcial do conteúdo hídrico, podendo atingir entre 8% e 12% de umidade. Porém, não resistem a teores de umidade abaixo desses valores, assim como ao armazenamento em baixas temperaturas (HONG; LININGTON; ELLIS, 1996; MEDEIROS; EIRA, 2006). Já as sementes recalcitrantes são intolerantes à dessecação e ao armazenamento a baixas temperaturas, podendo apresentar longevidade que varia entre poucas semanas e alguns meses (HONG; LININGTON; ELLIS, 1996; MEDEIROS; EIRA, 2006).

Considerando a viabilidade das sementes após a redução do seu teor hídrico, os bancos de sementes permitem a conservação eficaz apenas daquelas classificadas como ortodoxas e intermediárias. Ademais, a utilização dessa estratégia necessita de um monitoramento preciso do material armazenado para verificar sua viabilidade, assim como da renovação regular dos estoques (EMBRAPA, 2010).

As coleções de campo incluem os Jardins Botânicos e Arboretos e são utilizadas para espécies cuja conservação utilizando sementes é pouco eficiente. Entretanto, a manutenção de coleções de campo requer extensas áreas para implementação, elevados custos de manutenção e mão-de-obra especializada. Além disso, nessas condições, as coleções estão bastante suscetíveis a perdas devido a fatores bióticos e abióticos que colocam em risco a segurança dos acessos (ENGELMANN, 2011).

Sendo assim, espécies vegetais que: se propagam vegetativamente; apresentam sementes recalcitrantes; estão ameaçadas de extinção; têm potencial medicinal ou outra relevância; apresentam alguma limitação para o armazenamento em coleções de campo ou em bancos de sementes, necessitam de outras técnicas de conservação *ex situ*, tais como a conservação *in vitro* (ENGELMANN, 2004; PANIS; LAMBARDI, 2006).

1.1.1 Conservação *in vitro*

O armazenamento de germoplasma vegetal *in vitro*, consiste em uma estratégia de conservação *ex situ* complementar àquelas abordadas anteriormente. Diferentes métodos de conservação *in vitro* podem ser empregados dependendo do objetivo e do tempo de armazenamento requerido. A cultura de tecidos vegetais sob condições de crescimento ativo, crescimento lento e a criopreservação constituem as três principais ferramentas da conservação *in vitro*, que propiciam a manutenção do germoplasma viável a curto, médio e longo prazo, respectivamente, possibilitando seu acesso para o melhoramento vegetal (PENCE et al., 2002).

1.1.1.1 Cultura de tecidos vegetais

A Cultura de Tecidos Vegetais (CTV) abrange diversas técnicas que se baseiam no cultivo *in vitro*, em meio de cultura apropriado e sob condições

assépticas, de pequenos propágulos vegetais isolados da planta matriz, denominados explantes (GEORGE; HALL; KLERK, 2008b). Estas técnicas fundamentam-se na totipotência da célula vegetal, princípio pelo qual elas podem ser induzidas a voltar ao estado meristemático, redefinir seu padrão de diferenciação celular e, desta forma, dar origem a novos órgãos, embriões ou a uma planta completa (TERMIGNONI, 2005).

A cultura de tecidos inicia-se a partir de pequenos órgãos ou fragmentos de tecidos, denominados explantes, retirados da planta matriz. A escolha adequada do explante é um fator muito importante para iniciar o cultivo *in vitro*, já que o grau de maturidade e o estádio fisiológico do material vegetal podem influenciar na capacidade de regeneração. O explante utilizado deve estar em ótimas condições fitossanitárias e livre de agentes contaminantes (bactérias e fungos) que podem interferir no processo através da produção de toxinas ou competição por nutrientes. Sendo assim, antes de iniciar o cultivo *in vitro,* é necessário eliminar os microrganimos da superfície dos explantes através do processo de desinfestação (GEORGE; HALL; KLERK, 2008b).

A composição do meio de cultivo em que os explantes serão inoculados também pode afetar o desenvolvimento das culturas. Os meios de cultivo são formulações que contêm substâncias essenciais para o crescimento e desenvolvimento do material *in vitro,* tais como água, uma fonte doadora de carbono que em geral é a sacarose, macro e micronutrientes, vitaminas, podendo ser solidificados ou não (ILIEV et al., 2010). Em 1962, Murashige e Skoog propuseram uma formulação balanceada em nutrientes e vitaminas, o meio MS, que é amplamente utilizada para o cultivo *in vitro* de diversas espécies vegetais até os dias de hoje.

Além da sua composição padrão, os meios de cultura podem conter reguladores de crescimento, substâncias que possuem ação fisiológica similar a dos fitormônios naturais. Dentre os mais utilizados na CTV destacam-se as auxinas ácido naftalenoacético (ANA), ácido indolbutírico (AIB), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e o ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico (PIC), e as citocininas 6-benzilaminopurina (BAP) e, 6-furfurilamino-purina (KIN) (GEORGE; HALL; KLERK, 2008b; ILIEV et al., 2010).

A morfogênese *in vitro* é resultado da relação entre o crescimento e a diferenciação celular, podendo ser influenciada por diversos fatores, tais como: a

idade e origem do explante, condições fisiológicas e fitossanitárias da planta matriz, composição do meio de cultura, classe e concentração de reguladores de crescimento, intensidade luminosa, temperatura, tipo de frasco para acondicionamento e grau de trocas gasosas com o ambiente (CALDAS; HARIDASAN; FERREIRA, 1998; PERES, 2002; GUERRA; NODARI, 2006).

Uma das técnicas de CTV mais utilizadas é a micropropagação através da qual pode-se obter plantas *in vitro* de forma rápida e homogênea, em um espaço reduzido e independentemente de variações sazonais. Para tal, os explantes desinfestados passam pelos estágios de multiplicação e enraizamento e, por último, são gradativamente transferidos para condições *ex vitro* (aclimatação). Dependendo do material vegetal e das condições de cultura, a micropropagação pode ser alcançada a partir da proliferação de meristemas pré-existentes, da organogênese ou da embriogênese somática (GEORGE; HALL; KLERK, 2008a).

A cultura a partir do desenvolvimento de meristemas pré-existentes consiste no isolamento e desenvolvimento de regiões meristemáticas, ápices caulinares e gemas axilares, resultando em plantas completas (GEORGE; HALL; KLERK, 2008a).

A organogênese decorre de sistemas de regeneração de eixos caulinares ou raízes adventícias a partir da indução e multiplicação de tecidos diferenciados. Já na embriogênese somática, ocorre a indução da formação de embriões não-zigóticos que posteriormente originarão plantas completas através de estágios semelhantes à embriogênese zigótica (GUERRA; NODARI, 2006).

Tanto a organogênese como a embriogênese somática podem ocorrer de forma direta ou indireta. O processo direto é caracterizado pelo desenvolvimento de estruturas diretamente a partir do explante. Por ser resultado de tecidos naturalmente competentes à proliferação, esta via geralmente permite a manutenção da estabilidade genética em relação à planta de origem. No processo indireto, a regeneração é precedida pela formação de calos, massas celulares que se multiplicam desordenadamente (LEMOS, 2010). Embora o processo indireto apresente um elevado potencial regenerativo devido às altas taxas de multiplicação celular, o material fica mais suscetível a variações somaclonais (GUERRA; NODARI, 2006), termo estabelecido por Larkin e Scowcroft (1981) para caracterizar a variabilidade genética que pode ocorrer no material submetido ao cultivo *in vitro*.

Para a manutenção das culturas *in vitro*, os propágulos são submetidos a diversos subcultivos. O estresse resultante dos frequentes subcultivos pode induzir

variações somaclonais. Assim, as plantas regeneradas parecem não mais manter os padrões clonais do seu genótipo doador devido a mudanças genéticas e/ou epigenéticas. Quando são de origem genética, as variações são transmitidas de forma hereditária para a progênie de forma estável, pois ocorrem em nível do DNA devido a fatores como: quebra de cromátides, migrações desbalanceadas de cromossomos durante a divisão celular, inversões, translocações, deleções e duplicações. Já as variações epigenéticas, mudanças reversíveis que não alteram a sequência de nucleotídeos do DNA, estão relacionadas a alterações no padrão de metilação do DNA, modificações de histonas e ação de RNAs não codificadores (BAIRU; AREMU; STADEN, 2011).

Com a possibilidade do aumento da biomassa vegetal, pode-se utilizar plantas micropropagadas como fonte de material para a extração direta de metabólitos de interesse, minimizando a exploração dos recursos naturais. Além da micropropagação, a cultura de órgãos (especialmente a de raízes), as culturas de calos e de células em suspensão são outras técnicas de CTV que têm sido amplamente utilizadas para a produção *in vitro* de metabólitos de interesse (KOLEWE; GAURAV; ROBERTS, 2008; RAMACHANDRA-RAO; RAVISHANKAR, 2002; VANISREE et al., 2004). Através da manipulação das condições de cultura é possível modular diferentes rotas biossintéticas, interferindo na produção de moléculas bioativas. O cultivo *in vitro*, além de otimizar a produção de metabólitos secundários, normalmente produzidos em pequenas quantidades na planta *in situ,* pode até mesmo estimular a síntese de substâncias que em tais condições não eram encontradas (AMARAL; SILVA, 2003; VANISREE et al., 2004). Sendo assim, a CTV representa uma importante alternativa para a conservação vegetal *in vitro* em curto prazo, principalmente para aquelas espécies com difícil multiplicação pelos métodos convencionais.

Embora sejam evidentes as vantagens da CTV, a manutenção de um banco de germoplasma *in vitro* em condições de crescimento ativo requer subculturas a intervalos periódicos, o que aumenta os custos, o risco de contaminação, a possibilidade de perda do potencial biossintético, a ocorrência de variações somaclonais, assim como a necessidade de mão-de-obra especializada para a manutenção das coleções (BAIRU; AREMU; STADEN, 2011). Portanto, faz-se necessário investir em um sistema de conservação em longo prazo, que minimize esses problemas.

1.1.1.2 Criopreservação

Nas últimas décadas, têm sido crescentes os estudos visando à conservação em longo prazo de genomas de interesse por criopreservação, que consiste na manutenção do material biológico em temperaturas ultra-baixas em nitrogênio líquido (-196ºC) ou em sua fase de vapor (-150°C) (BENSON, 2008). A essas temperaturas, a taxa de difusão molecular torna-se bastante reduzida e a maioria dos processos metabólicos são interrompidos, permitindo o armazenamento do germoplasma vegetal por longos períodos de tempo (ENGELMANN, 2010; SANTOS, 2000), em espaço físico reduzido e diminuindo a necessidade de manutenções periódicas (SAKAI; ENGELMANN, 2007).

Diversos tipos de materiais têm sido conservados por este método, dentre eles destacam-se sementes, pólen, embriões, ápices caulinares, suspensões celulares, protoplastos e meristemas (CARVALHO; VIDAL, 2003). Em geral, regiões meristemáticas são mais indicadas para a criopreservação já que apresentam tamanho reduzido, células com pequenos vacúolos, em constante divisão celular e alta taxa nucleocitoplasmática, características que lhe conferem alto potencial de tolerância osmótica. Além disso, é fundamental que o explante utilizado esteja em ótimas condições fisiológicas e sob crescimento ativo (ENGELMANN, 2011). Explantes localizados em diferentes posições no vegetal ou de diferentes idades apresentam condições fisiológicas distintas, tais como grau de maturação e níveis hormonais endógenos, podendo interferir no resultado da criopreservação (GEORGE; HALL; KLERK, 2008b).

A maioria dos materiais vegetais utilizados na criopreservação apresenta alto teor hídrico e, por isso, são extremamente sensíveis à injúria causada pelo resfriamento (ENGELMANN, 2010). Um dos maiores desafios do estabelecimento de protocolos de criopreservação é evitar a ruptura do sistema de membranas celulares que ocorre, principalmente, pela formação de cristais de gelo no meio intracelular, podendo levar à morte das células (SANTOS, 2001). A injúria mecânica sofrida pelas células ocorre devido ao comportamento peculiar da água que, ao atingir temperaturas muito baixas, sofre uma reorganização estrutural, expandindo o seu volume, resultando na formação de cristais de gelo. Como a maioria dos materiais vegetais utilizados na criopreservação apresenta altos teores hídricos, é

fundamental que eles passem por etapas de desidratação antes da imersão em nitrogênio líquido (SANTOS, 2001; ENGELMANN, 2011).

Diversas estratégias podem ser empregadas para induzir a desidratação sem alterar o teor de água estrutural das células, ou seja, a água que faz parte da estrutura das moléculas orgânicas. A metodologia clássica baseia-se na desidratação induzida por congelamento, que é alcançada através do resfriamento lento. Para tal, o material é submetido à gradual redução da temperatura a uma velocidade controlada (0,5 à 2ºC/minuto) em valores previamente definidos (-40°C à -70°C), seguida da imersão em nitrogênio líquido (ENGELMANN, 2011). A diminuição gradual da temperatura favorece inicialmente a formação de gelo no meio extracelular que, por diferença de pressão de vapor, induz a saída da água intracelular e, consequentemente, o acúmulo de solutos dentro da célula (BENSON, 2008). O aumento da concentração celular contribui para que o resfriamento ocorra de forma mais rápida, evitando a formação de cristais de gelo no meio intracelular (BENSON, 2008; ENGELMANN, 2010). Entretanto, essa técnica apresenta algumas limitações, tal como a dificuldade de aplicação para tecidos complexos que, devido a sua composição celular variada, requerem condições específicas de desidratação induzida por congelamento (ENGELMANN, 2010). Além disso, esta técnica também apresenta baixa aplicabilidade para espécies tropicais que são tipicamente suscetíveis ao dano por resfriamento, uma vez que não apresentam estratégias naturais de tolerância à redução da temperatura. Diferentemente, espécies de clima frio apresentam adaptações, como a síntese de proteínas anticongelamento, que se ligam aos cristais de gelo evitando ou retardando o seu crescimento e o acúmulo de açúcares solúveis (GERY et al., 2011; GRIFFITH; YAISH, 2004).

Já as técnicas de criopreservação desenvolvidas mais recentemente baseiam-se no processo de vitrificação a partir do qual as soluções celulares altamente concentradas atingem o estado vítreo quando são resfriadas abaixo da temperatura de congelamento. O estado vítreo consiste na transição da fase líquida da água diretamente para um estado sólido amorfo o qual lhe confere as propriedades mecânicas de um sólido, sem que haja a formação de uma estrutura cristalina (FAHY et al., 1984; SANTOS, 2000).

Para atingir o estado vítreo, é necessário remover a maior quantidade possível da água congelável das células antes da imersão em nitrogênio líquido (NL). Esse procedimento pode ser realizado por meio da desidratação evaporativa

(dessecação em fluxo laminar ou pela exposição do material à sílica gel) ou osmótica, com a exposição do material a soluções altamente concentradas. Assim, o citoplasma da célula se torna altamente concentrado e viscoso, diminuindo a capacidade de rearranjo das moléculas de água restantes em forma de cristais de gelo durante a exposição a temperaturas subzero (SAKAI; ENGELMANN, 2007; BENSON 2008). Além disso, esse processo contribui para a manutenção da estabilidade do material durante o resfriamento, já que nessas condições a taxa de difusão intracelular é reduzida, levando a um estado de quiescência metabólica (KOSTER, 1991).

Dentre as técnicas de criopreservação baseadas no processo de vitrificação, destacam-se: vitrificação, encapsulamento-desidratação, encapsulamento-vitrificação, vitrificação em gotas, desidratação em crioplacas (d-crioplacas) e vitrificação em crioplacas (v-crioplacas).

Na vitrificação (SAKAI et al., 1990), o explante é submetido à desidratação através do tratamento com soluções enriquecidas com altas concentrações de substâncias crioprotetoras antes da imersão em NL (ENGELMANN, 2011). Os crioprotetores são substâncias que promovem a desidratação e reduzem a injúria sofrida pela célula, principalmente durante as etapas de resfriamento e reaquecimento. O papel crioprotetor dessas substâncias parece estar relacionado ao fato de evitarem a formação de cristais de gelo pelas fortes interações estabelecidas com a água, resultando na diminuição do ponto de fusão e mobilidade das moléculas de água (MURTHY, 1998).

De acordo com a sua habilidade em atravessar as membranas celulares, os crioprotetores podem ser classificados em dois tipos: penetrantes e não-penetrantes (MULDREW; MCGANN, 1999). Os penetrantes conseguem ultrapassar a membrana plasmática e agem aumentando a viscosidade do meio intracelular. O dimetilsulfoxido (DMSO), o etilenoglicol e o propilenoglicol, são exemplos de crioprotetores penetrantes. Já os não-penetrantes, induzem a desidratação devido ao aumento da osmolaridade extracelular (MULDREW; MCGANN, 1999; BENSON, 2008). Como exemplo de crioprotetores não-penetrantes, pode-se citar a sacarose, a polivinilpirrolidona (PVP), o óxido de polietileno e o hidroxietilamido. O glicerol apresenta um comportamento peculiar, já que à temperatura ambiente, consegue penetrar as membranas, o que não ocorre quando usado a 0°C (MULDREW; MCGANN, 1999).

Essas substâncias crioprotetoras podem ser utilizadas isoladamente ou em combinação, compondo as chamadas soluções de vitrificação. Diversas soluções crioprotetoras já foram estabelecidas, dentre estas, destacam-se as *Plant Vitrification Solutions* (PVS) que contêm tanto substâncias penetrantes quanto não-penetrantes e diferem entre si de acordo com o tipo e a concentração de cada componente (BENSON, 2008) (Quadro 1).

Quadro 1 - Composição de diferentes soluções de vitrificação.

Solução	Glicerol	Etilenoglicol	DMSO	Sacarose	Referência
PVS1	30%	15%	15%	5%	URAGAMI et al., 1989
PVS2	30%	15%	15%	0,4 M	SAKAI; KOBAYASHI; OIYAMA, 1990
PVS3	50%	-	-	50%	NISHIZAWA et al., 1993
PVS4	35%	20%	-	0,6M	SAKAI, 2000
VSL	10%	10%	10%	45%	LIU; WANG; LIU, 2004

Muitos protocolos de vitrificação já foram desenvolvidos com sucesso para diversas espécies vegetais, utilizando diferentes estruturas, principalmente ápices e suspensões celulares (SAKAI; ENGELMANN, 2007). Entretanto, dependendo do material vegetal utilizado para a criopreservação, a exposição diretamente às soluções crioprotetoras pode ser tóxica, assim como a manipulação dos explantes se torna dificultada (VERLEYSEN et al., 2005). Sendo assim, metodologias baseadas no encapsulamento prévio em alginato de cálcio são indicadas, principalmente, para materiais mais delicados.

Na técnica de encapsulamento-desidratação (FABRE; DEREUDDRE, 1990), a redução do teor hídrico do material encapsulado pode ser realizada através da desidratação em solução enriquecida com sacarose em associação, ou não, com a dessecação evaporativa em fluxo laminar ou sílica gel.

A associação das duas técnicas abordadas anteriormente levou ao desenvolvimento do encapsulamento-vitrificação, técnica em que as cápsulas são expostas a soluções de vitrificação antes do congelamento (BENSON, 2008). Assim, o tempo gasto com os tratamentos de dessecação evaporativa é minimizado e as

dificuldades da manipulação de um grande número de explantes pequenos são reduzidas (SAKAI; ENGELMANN, 2007).

Atualmente, outras técnicas como a vitrificação em gotas (*droplet vitrification*) (PANIS et al., 2005) e a vitrificação em crioplacas (v-*cryo-plates*) (YAMAMOTO et al., 2011) vêm ganhando espaço. Estas técnicas diferem entre si de acordo com o suporte utilizado para o resfriamento. Enquanto na vitrificação em gotas folhas de alumínio são utilizadas como suporte, para a vitrificação em crioplacas são empregadas placas de alumínio (SAKAI; ENGELMANN, 2007; YAMAMOTO et al., 2011). Tais recursos permitem alcançar taxas extremamente rápidas de resfriamento e reaquecimento devido ao pequeno volume de solução crioprotetora utilizada e pelo baixo calor específico do alumínio que lhe confere uma alta taxa de transferência de calor (SAKAI; ENGELMANN, 2007; LEUNUFNA; KELLER, 2009).

A vitrificação utilizando crioplacas de alumínio foi descrita inicialmente para ápices caulinares de *Tanacetum cinerariifolium* (YAMAMOTO et al., 2011), mas vem sendo implementada com sucesso para outras espécies (ENGELMANN-SYLVESTRE; ENGELMANN, 2015; NIINO et al., 2013; RAFIQUE et al., 2015; SEKIZAWA et al., 2011; YAMAMOTO et al., 2012a; YAMAMOTO et al., 2012b; YAMAMOTO et al., 2015). A metodologia consiste na aderência do material vegetal à placa de alumínio com auxílio das soluções de alginato de sódio e cloreto de cálcio ($CaCl_2$). O material aderido à crioplaca passa pelas etapas de desidratação osmótica e, em seguida, é imerso diretamente em nitrogênio líquido. Sendo assim, a técnica oferece uma maior rapidez, praticidade na manipulação dos explantes e proporciona um baixo nível de injúria ou perda de material durante o processo (YAMAMOTO et al., 2011).

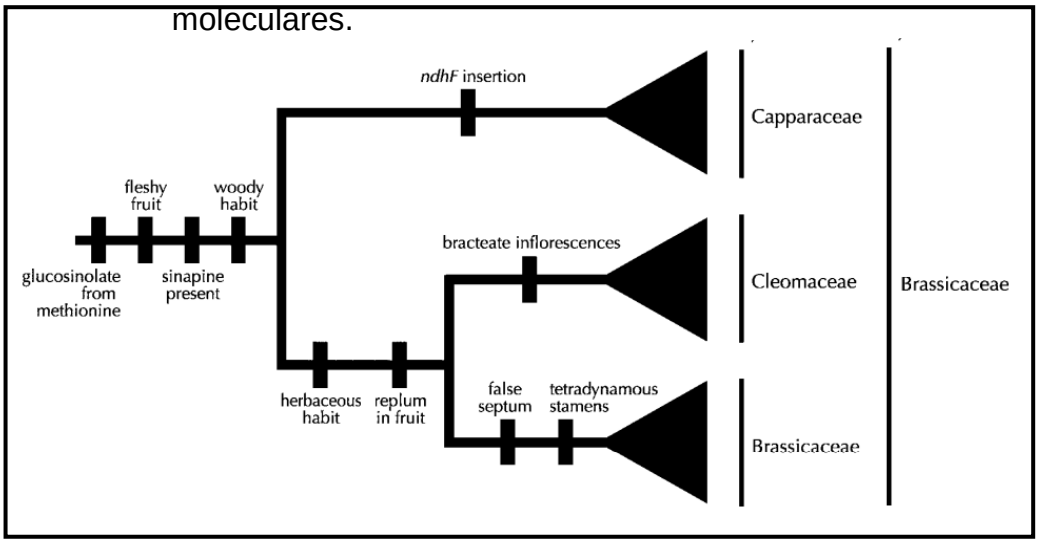
1.2 ***Cleome spinosa* Jacq.**

Cleome é o gênero com maior representatividade na família Cleomaceae, apresentando mais de 200 espécies distribuídas em regiões tropicais e subtropicais, sendo 30 nativas do Brasil (VOZNESENSKAYA et al., 2007; PEREIRA et al., 2007).

Inicialmente, o gênero *Cleome* era classificado como pertencente à família Capparaceae, que tem sua filogenia questionada em relação à família Brassicaceae.

Análises filogenéticas utilizando dados morfológicos (JUDD; SANDERS; DONOGHUE, 1994) e moleculares (RODMAN et al., 1998) indicaram que o gênero *Cleome* estaria mais relacionado à Brassicaceae do que outros gêneros pertencentes à Capparaceae. Esses estudos permitiram o agrupamento de ambas as famílias em uma única, a Brassicaceae (Figura 1). Entretanto, estudos taxonômicos recentes utilizando DNA presente em cloroplastos e baseados na filogenética molecular, sugeriram a separação do clado Brassicaceae em três famílias de origem monofilética: Capparaceae, Brassicaceae e Cleomaceae, conforme ilustrado na Figura 1 (HALL et al., 2002).

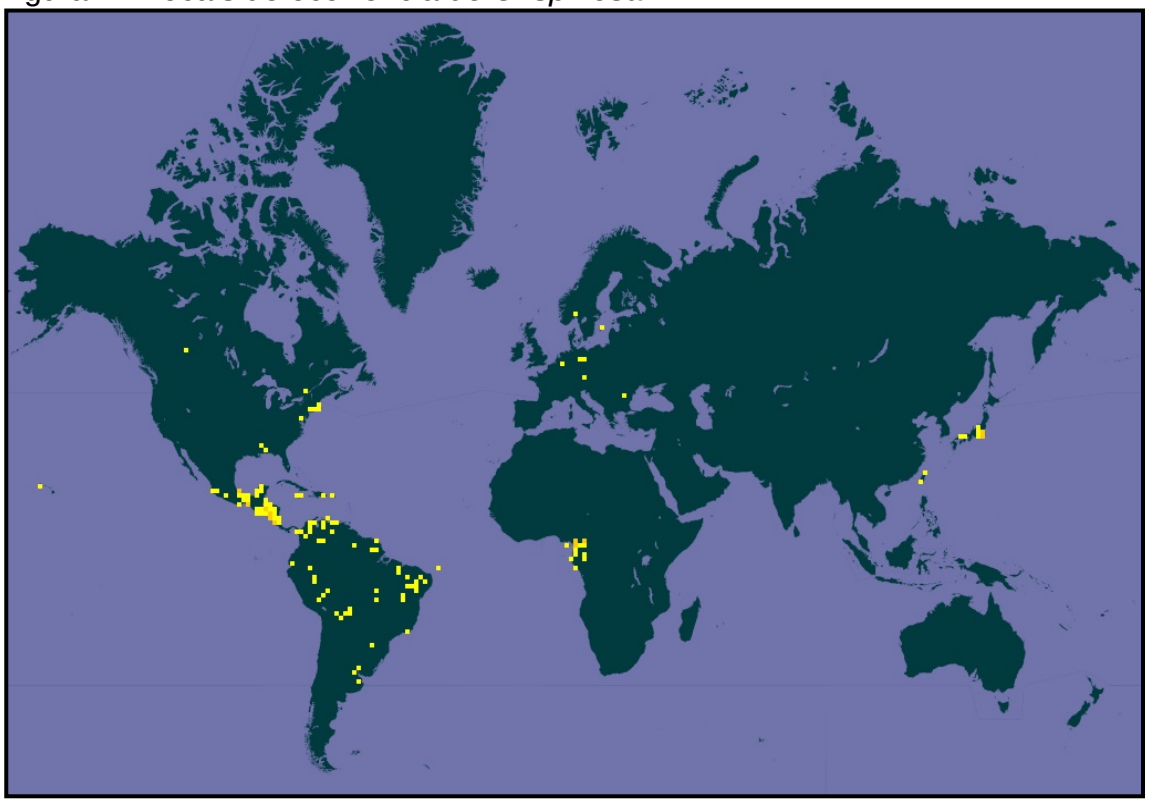
Figura 1 - Representação filogenética dos clados Brassicaceae, Cleomaceae e Capparaceae com base em dados moleculares.



Legenda: Caracteres morfológicos distintivos foram utilizados para representar sinapomorfias dos grupos. Adaptado de HALL et al., 2002.

Conhecida popularmente como mussambê, mussambê-de-espinho, sete-marias, beijo-fedorento e planta-aranha, a espécie *Cleome spinosa* Jacq., ocorre nas Américas, Central e do Sul, e na África (TROPICOS.ORG, 2013) (Figura 2). É geralmente encontrada em áreas urbanas, as quais estão sujeitas a intenso impacto antrópico, o que pode levar ao desaparecimento de algumas populações (ALBARELLO et al., 2006).

Figura 2 - Locais de ocorrência de *C. spinosa*.



Fonte: *Global Biodiversity Information Facility*, http://www.gbif.com.
Acesso em:jan. 2014.

Cleome spinosa é uma espécie herbácea (Figura 3a) e perene, podendo atingir cerca de 1 m de altura. Apresenta inflorescências terminais, racemosas e de coloração branca (Figura 3b). Suas folhas são compostas (digitadas), alternas, com estípulas e pecioladas (Figura 4a). Seu caule e suas folhas podem apresentar tricomas glandulares, que lhes conferem um cheiro forte característico. As flores são zigomórficas, hermafroditas e a antese é crepuscular, caracterizando-se pela separação das pétalas e exteriorização dos órgãos reprodutivos (Figura 4b). A espécie apresenta floração assincrônica, ou seja, as flores não se abrem ao mesmo tempo nas inflorescências, já que suas flores apresentam um tempo de vida curto (aproximadamente 72 horas). Apresentam frutos simples, secos, do tipo síliqua, capsular, bicarpelar com deiscência longitudinal e de coloração verde (Figura 4c), porém quando se tornam maduros, sua cor é alterada para bege. Cada fruto abriga cerca de 130 sementes que apresentam um comprimento médio de 1,5 mm (CASTRO et al., 2014) (Figura 4d). A espécie se propaga principalmente por sementes, contudo, sua germinação requer um longo tempo e temperatura

específica, de modo que são alcançadas baixas taxas de germinação (QUIN et al., 2012).

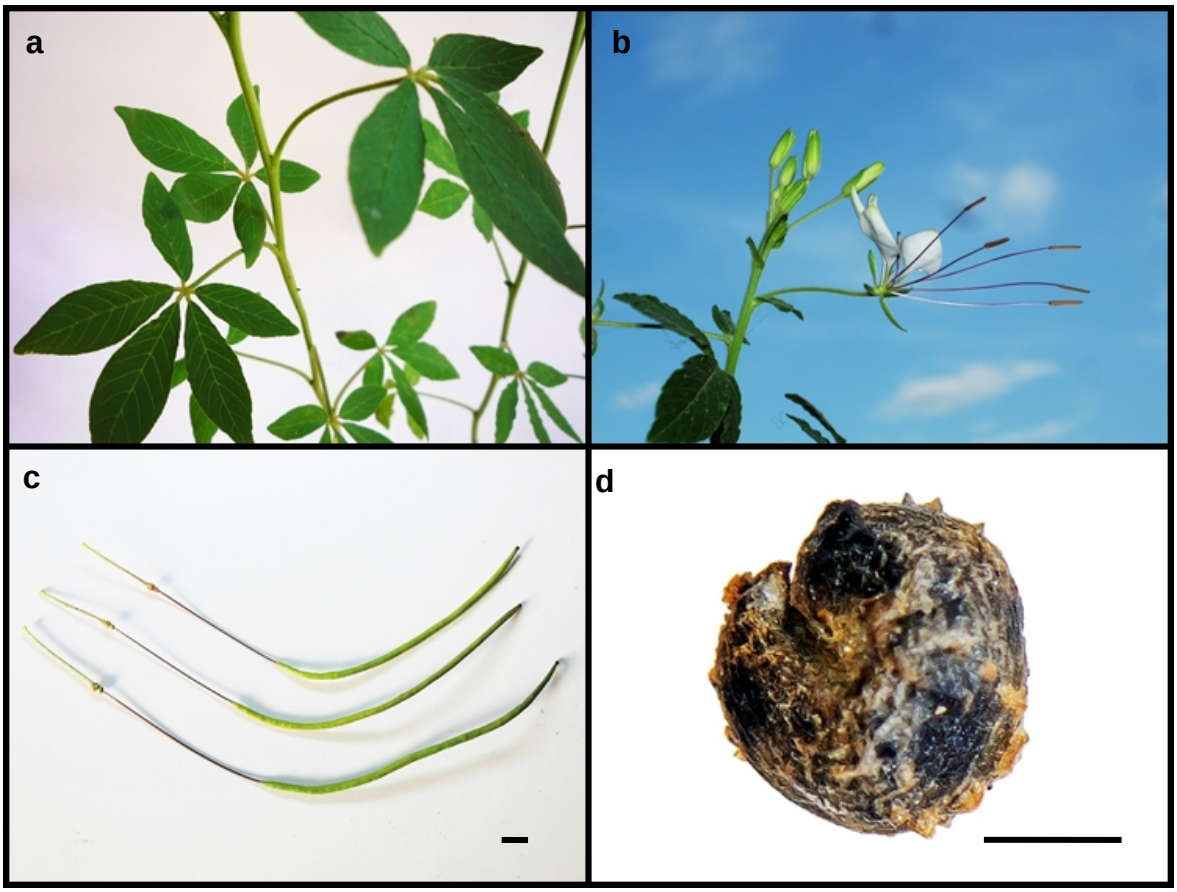
Alguns atributos florais presentes em *C. spinosa*, tais como a inflorescência de coloração branca, a antese crepuscular, o odor característico das flores e a produção abundante de néctar e pólen, constituem importantes mecanismos de atração para polinizadores, principalmente para morcegos, mariposas e abelhas (PEREIRA et al., 2007).

Cleome spinosa apresenta um importante valor ornamental, sendo frequentemente cultivada em jardins, devido à delicadeza e peculiaridade de sua inflorescência que forma uma estrutura semelhante a uma aranha, razão pela qual é conhecida como *flor de aranha* (Figura 3b). Além disso, seus brotos e folhas são comestíveis e garantem um efeito refrescante diminuindo o calor e a sede (DU, 1986 *apud* QUIN et al., 2012).

Figura 3 - *Cleome spinosa.*

Legenda: (a) - *Habitus* arbustivo; (b) - Detalhe da inflorescência.
Fonte: Foto de Thiago Barboza, 2013.

Figura 4 - Aspectos morfológicos de *C. spinosa.*



Legenda: (a) - Folhas compostas com filotaxia alterna; (b) - Flores hermafroditas, zigomórficas e com floração assincrônica; (c) - Frutos do tipo síliqua; (d) - Sementes.
Nota: . Barras = 1 cm.
Fonte: Foto do Acervo fotográfico do Labplan, 2014.

A espécie também apresenta uso na medicina tradicional, principalmente na região nordeste do Brasil. Folhas de *C. spinosa* são utilizadas na forma de infusão no combate à febre, gripe, tosse, bronquite e asma (AGRA et al. 2007), estimulam o aparelho digestório (LEAL, 2007) e, quando maceradas, podem ser aplicadas sobre a pele, agindo como rubefacientes (LEAL, 2007). Suas folhas também são eficazes no combate à inflamação de garganta (CONCEIÇÃO et al., 2011) e leucorreia (LEAL, 2007). Além disso, suas raízes são eficientes no tratamento de bronquites asmáticas (COLLINS et al., 2004).

Estudos *in vitro* indicaram atividade antimicrobiana de extratos etanólicos obtidos a partir de raízes e flores de *C. spinosa* (SANTOS; MENEZES, 2005). A avaliação do potencial citotóxico dos mesmos extratos revelou importante atividade larvicida frente a larvas de *Aedes aegypti* (SANTOS; MENEZES, 2005). Extratos da planta inteira apresentam ações gastroprotetoras, estimulantes do aparelho digestório e cicatrizante (CABRAL; AGRA, 1998), enquanto seus óleos essenciais demonstraram ação antioxidante, inseticida e antimicrobiana (MCNEIL et al., 2010).

Estudos fitoquímicos levaram à identificação e ao isolamento de substâncias extraídas de sementes de substâncias pertencentes ao grupo dos glicosinolatos (AHMED, et al, 1972), metabólitos secundários relacionados com a atividade antineoplásica e importantes agentes inseticidas. Também foram isolados de parte aérea, flavonas e diterpenos do tipo cembrano, substâncias conhecidas por apresentarem atividades anti-HIV, citotoxicidade contra linhagens celulares tumorais e neuroproteção (COLLINS et al., 2004). Extratos hidroalcoólicos da parte aérea submetidos a uma análise fitoquímica revelaram a presença de alcaloides, flavonoides, xantonas, saponinas e leucoantocianidinas (LEAL et al., 2007).

Além do uso ornamental e medicinal, *C. spinosa,* destaca-se também como matriz para a indústria de cosméticos relacionados com o crescimento capilar, podendo ser utilizada em formulações de uso tópico (*shampoo*, *spray* gel, cremes e loções) ou oral (cápsulas e comprimidos). Estudos demonstraram que extratos de caule, folhas, flores e frutos apresentam um alto teor de aminoácidos sulfurados, principalmente o aminoácido cisteína, que é um dos 21 componentes da queratina, proteína que constitui o córtex da fibra capilar. Dessa forma, o extrato da planta é capaz ajudar na reconstrução da queratina que é perdida diariamente por meio de agressões físicas e químicas. Além disso, o extrato também está relacionado ao

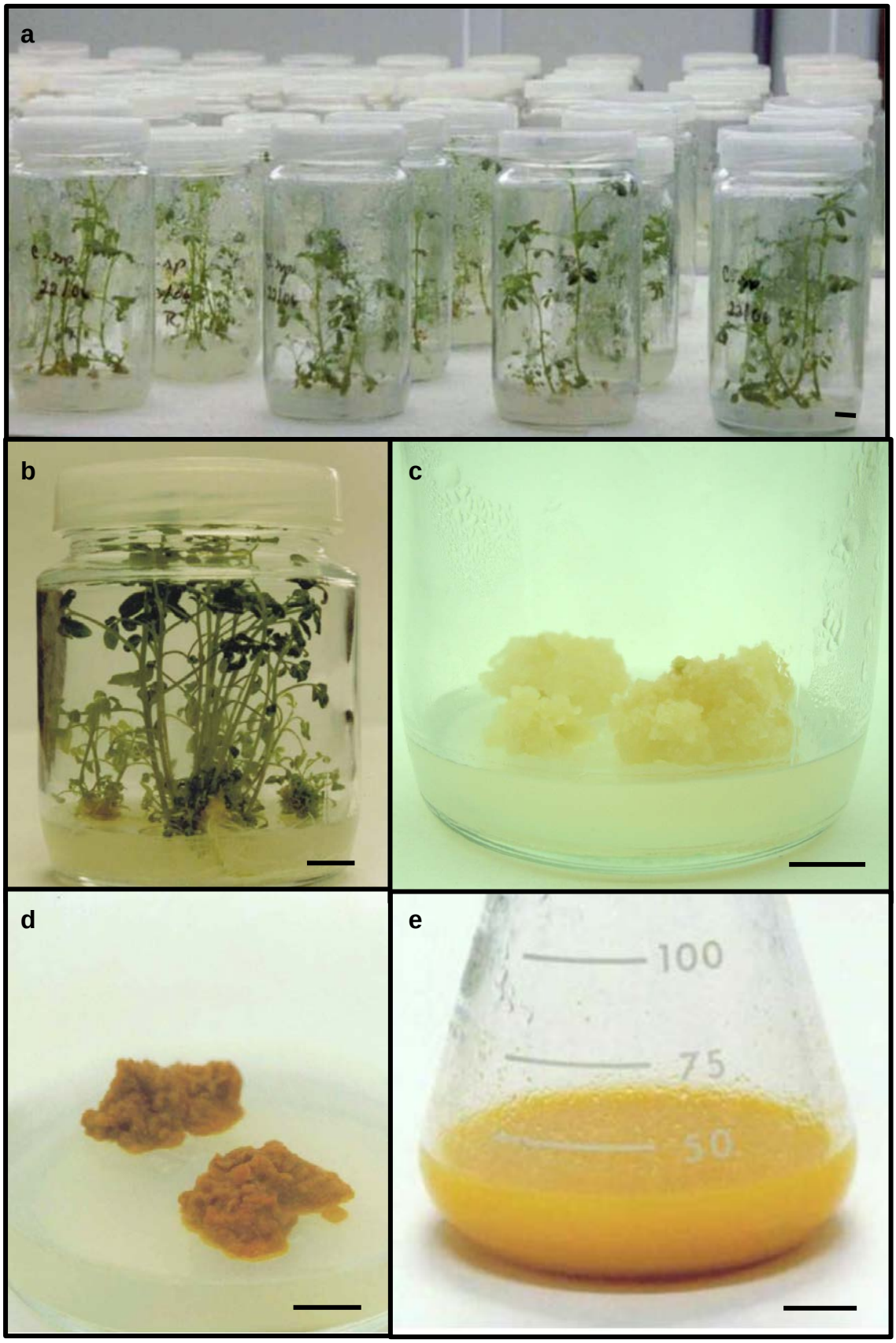
prolongamento da fase anágena do ciclo capilar, caracterizada pelo crescimento da haste do cabelo (BELLE; BELAUBRE, 2011).

Tendo em vista sua importância econômica devido ao seu potencial medicinal e ornamental, além da vulnerabilidade dos seus locais de ocorrência e da dificuldade de germinação, diversas metodologias biotecnológicas vêm sendo desenvolvidas para a espécie, visando à produção de plantas e substâncias bioativas. Os primeiros trabalhos envolvendo cultura de tecidos vegetais de *C. spinosa* objetivavam estudar o efeito de auxinas, citocininas e ácido giberélico na indução de calos, diferenciação de gemas e enraizamento a partir de explantes cotiledonares e hipocotiledonares (MIAO et al., 1990; WANG et al., 2004). Embora tenham sido estabelecidos meios de cultura adequados, não foram obtidos altos valores de taxas de diferenciação e enraizamento.

A espécie vem sendo alvo de estudos biotecnológicos no Laboratório de Biotecnologia de Plantas (Labplan) pertencente ao Núcleo de Biotecnologia Vegetal da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Albarello e colaboradores (2006) utilizaram explantes hipocotiledonares e epicotiledonares (segmentos nodais e internodais) para determinar a melhor concentração e combinação de fitorreguladores para o estabelecimento de um protocolo de micropropagação (Figura 5a). O maior número de brotos foi obtido a partir de explantes hipocotiledonares cultivados em meio MS suplementado com 1,0 $mg.L^{-1}$ de benziladenina (BA), sendo alcançada a produção de mais de 10 brotos por explante (Figura 5b). Protocolos de calogênese também já foram estabelecidos para a espécie, sendo alcançada a indução de linhagens celulares produtoras de pigmentos da classe dos carotenoides e linhagens não produtoras desses pigmentos. A maior produção de massa calogênica foi alcançada por culturas iniciadas a partir de explantes caulinares cultivados em meio contendo a auxina picloram (ALBARELLO et al., 2007) (Figura 5c), enquanto que a indução de calos produtores de carotenoides (Figura 5d) foi obtida pela inoculação dos explantes caulinares em meio suplementado com 1,0 $mg.L^{-1}$ da auxina 2,4-D (ALBARELLO, 2005). A partir de calos friáveis produtores de carotenoides também foram estabelecidas culturas de células em suspensão (ALBARELLO, 2005) (Figura 5e). As atividades anti-inflamatória e analgésica foram constatadas em extratos metanólicos obtidos a partir de plantas produzidas *in vitro* e coletadas a campo (ALBARELLO et al., 2013).

Em função dos resultados já alcançados com a espécie, torna-se relevante o desenvolvimento de estratégias de conservação em longo prazo por meio da criopreservação, para os materiais biotecnológicos já estabelecidos, assegurando, desta forma, a manutenção do seu potencial morfogenético.

Figura 5 - Estudos biotecnológicos realizados no Laboratório de Biotecnologia de Plantas (LABPLAN/UERJ) com a espécie *C. spinosa.*



Legenda: (a) Plantas micropropagadas mantidas em estoque em meio MS0; (b) Proliferação de brotos em culturas mantidas em meio MS + 1,0 $mg.L^{-1}$ BA; (c) Calos friáveis produzidos em meio MS + 0.1 $mg.L^{-1}$ PIC; (d) Calos produtores de carotenoides produzidos em MS + 1.0 $mg.L^{-1}$ 2,4-D; (e) Culturas de células em suspensão iniciadas a partir dos calos produtores de carotenoides. Fotos: Acervo fotográfico do Labplan. Barras = 1 cm.

2 **OBJETIVOS**

2.1 **Objetivo Geral**

Definir protocolos de criopreservação por vitrificação e v-crioplacas para explantes excisados de plantas cultivadas *in vitro* da espécie *Cleome spinosa.*

2.2 **Objetivos Específicos**

- ✓ Selecionar explantes adequados a serem usados nos protocolos de criopreservação;
- ✓ Avaliar o efeito de pré-tratamentos com soluções contendo diferentes concentrações de sacarose;
- ✓ Avaliar o efeito das soluções de vitrificação PVS2 e PVS3 na sobrevivência e recuperação dos materiais criopreservados;
- ✓ Monitorar o efeito do tempo de exposição às soluções de vitrificação;
- ✓ Determinar a influência da temperatura no tratamento com a solução PVS2.

3 METODOLOGIA

3.1 Material botânico e condições de cultura

Como fonte de explantes, foram utilizadas plantas propagadas *in vitro* de *Cleome spinosa* inicialmente estabelecidas a partir de explantes hipocotiledonares (5-8 mm) excisados de plantas germinadas sob condições *in vivo*, inoculados em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado com 1,0 $mg.L^{-1}$ de BAP (ALBARELLO et al., 2006). Um exemplar representativo da planta matriz que deu origem às culturas está depositado no herbário da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, sob registro HRJ 7639.

O estoque de plantas foi estabelecido há cerca de 3-4 anos e vem sendo mantido através de subcultivos mensais, quando segmentos caulinares de 2-3cm contendo a região apical são excisados e inoculados em frascos de cultura (12 x 5 cm) contendo 30 mL de meio fresco. Para os subcultivos é utilizado meio MS sólido sem suplementação hormonal (MS0), acrescido de 30 $g.L^{-1}$ de sacarose e solidificado com 8 $g.L^{-1}$ de ágar. O pH do meio é ajustado para 5,8 antes da autoclavagem e as culturas são mantidas em câmara de crescimento à temperatura de 25 ± 2 °C, sob intensidade luminosa de 45 µmol m^{-2} s^{-1} e fotoperíodo de 16 horas.

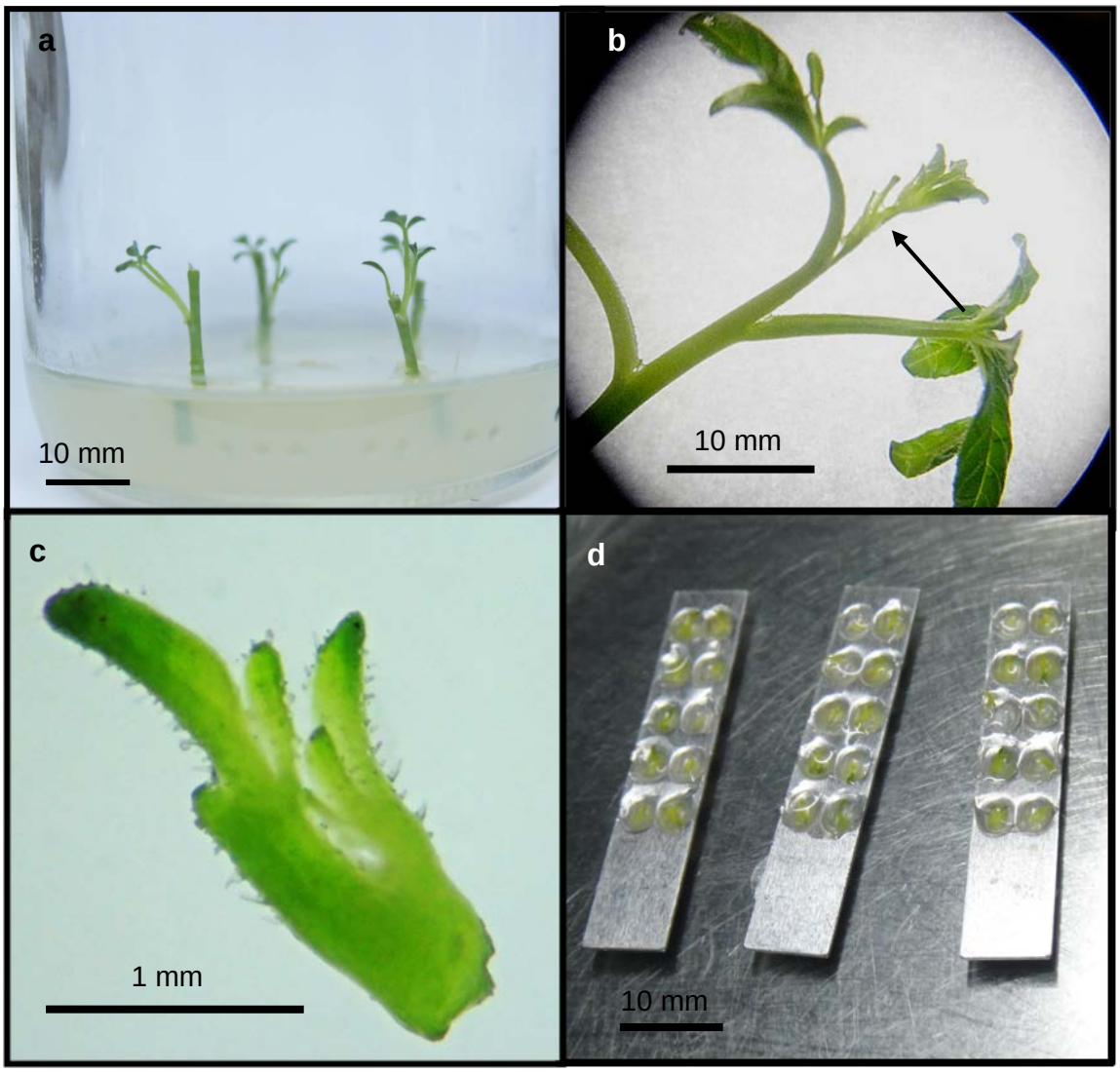
3.2 Seleção de explantes

A partir das plantas estoque foram isolados segmentos de diferentes regiões do caule para a avaliação da viabilidade de regeneração dos explantes selecionados. Foram seccionados ápices caulinares (1,5 mm), segmentos nodais (2 mm) e segmentos internodais (2, 3 e 5 mm). Os segmentos nodais e os ápices caulinares foram inoculados em meio MS0, enquanto segmentos internodais foram inoculados em meio MS suplementado com 1,0 $mg.L^{-1}$ 2,4-D (ALBARELLO, 2005). O material foi observado por 30 dias para avaliação da resposta morfogênica.

Após a definição do melhor explante, foram preparadas microestacas (1 cm), contendo pelo menos uma gema axilar, que foram inoculadas em frascos de cultura

contendo 30 mL de meio MS0 (5 microestacas/frasco) (Figura 6a). Ápices caulinares (1,5 mm), contendo primórdios foliares (Figura 6b), cultivados por 2-3 semanas foram excisados (Figura 6c) em câmara de fluxo laminar com o auxílio de um microscópio estereoscópio e utilizados nos ensaios de criopreservação.

Figura 6 - Ápices caulinares de *C.spinosa* para criopreservação.



Legenda: (a) Microestacas; (b) Material a ser retirado (seta); (c) Explante isolado; (d) Ápices aderidos à crioplaca.
Fotos: A autora, 2014.

3.3 **Criopreservação**

Foram avaliadas duas técnicas de criopreservação: vitrificação (SAKAI; KOBAYASHI; OIYAMA., 1990) e v-crioplacas (YAMAMOTO et al., 2011).

3.3.1 Pré-cultura

Ápices caulinares foram pré-cultivados por 24 horas em meio MS suplementado com diferentes concentrações de sacarose (0,25; 0,3; 0,5 ou 0,7 M), ou submetidos a concentrações crescentes de sacarose (0,25 M - 0,5 M), permanecendo 24 horas em cada concentração. Os ápices foram inoculados em placas de Petri (90x15 mm) contendo 20 mL de meio de pré-cultura sólido e mantidos sob as mesmas condições de cultura descritas anteriormente para as plantas estoque, porém sob intensidade luminosa reduzida (20 µmol m^{-2} s^{-1}). Para avaliar a viabilidade após a etapa de pré-cultivo, o material foi transferido para meio MS0 e observado por 30 dias.

Para a determinação do teor hídrico, 15 ápices submetidos a cada um dos tratamentos foram secos em estufa a 45 °C por 24 horas e o cálculo do teor hídrico obedeceu a seguinte fórmula:

$$Teor\ hídrico = \frac{(PF - PS)}{PF} \text{ x } 100$$

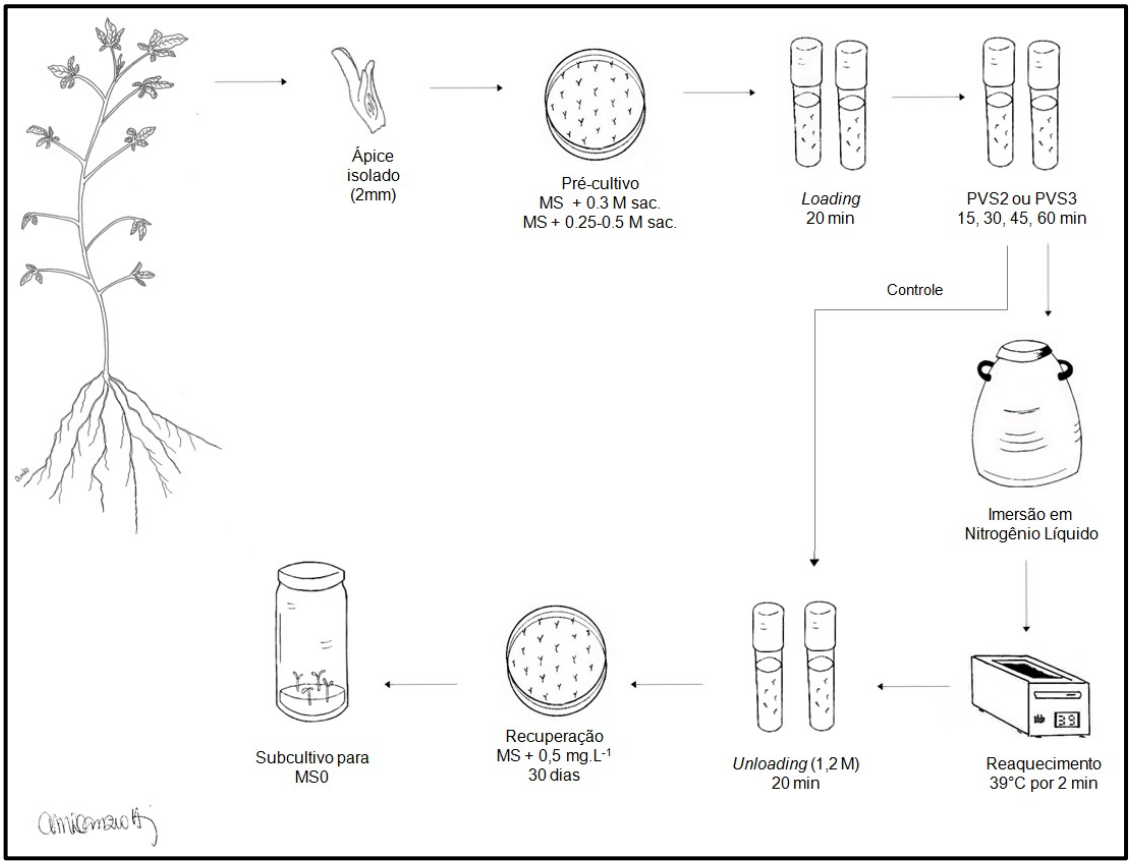
3.3.2 Vitrificação

Os ápices pré-cultivados foram transferidos para criotubos de 2 mL (5 ápices/criotubo) e imersos em 800 µL de solução de *loading*, segundo NISHIZAWA et al., 1993 (2,0 M de glicerol e 0,4 M de sacarose), por 20 minutos. Em seguida, foram expostos por diferentes tempos (0, 15, 30, 45 ou 60 minutos) a 800 µL das

soluções de vitrificação PVS2, segundo Sakai, Kobayashi e Oiyama em 1990 (30% glicerol, 15% etilenoglicol, 15% de DMSO e 0,4 M de sacarose), ou PVS3, segundo Nishizawa e colaboradores em 1993 (50% de glicerol e 50% de sacarose), preparadas em meio MS. A exposição à PVS2 foi realizada à temperatura ambiente e a 0°C. Todas as outras etapas foram realizadas somente à temperatura ambiente. As soluções de vitrificação foram substituídas por uma de igual composição antes da imersão dos criotubos em nitrogênio líquido (-196°C), por 1 hora.

O protocolo de vitrificação utilizado está esquematizado na Figura 7.

Figura 7 - Esquema da metodologia utilizada para os experimentos de vitrificação.



Fonte:Ilustração de Adriana Lanziotti, 2014.

3.3.3 V-Crioplacas

Foram utilizadas crioplacas de alumínio (7 mm largura x 37 mm comprimento x 0.5 mm espessura), cada uma com 10 poços (1,5 mm largura x 2,5 mm comprimento x 0,75 mm profundidade). As placas foram cedidas pelos pesquisadores Dr Florent Engelmann (IRD/Montpellier - França) e Dr. Takao Niino (NIAS/ Tsukuba - Japão).

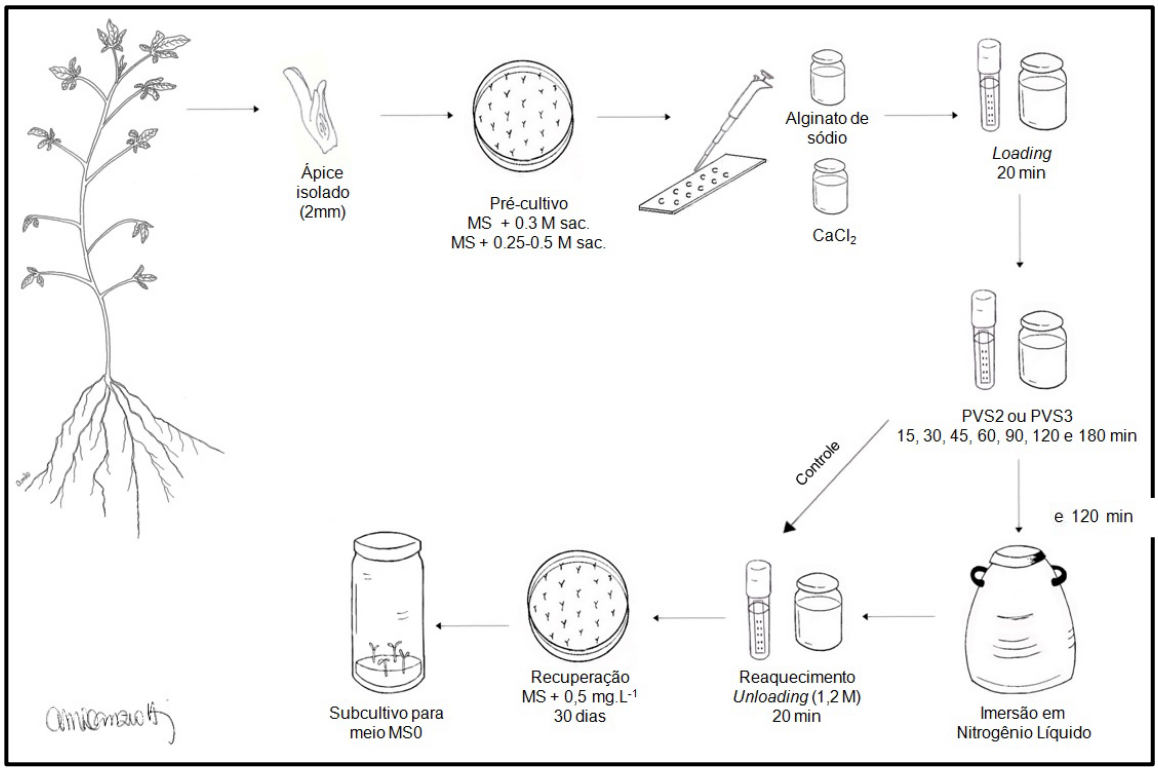
Inicialmente, com o auxílio de uma pipeta, foi colocada uma gota (2 µL) de solução de alginato de sódio (3%) em cada poço da crioplaca para garantir a aderência do material vegetal. Em seguida, os ápices pré-cultivados foram depositados sobre a solução de alginato de sódio e o volume no poço foi completado com mais uma gota da solução. Após essa etapa, a solução de $CaCl_2$ foi gotejada ao longo da superfície das crioplacas, permanecendo por 15 minutos até a completa polimerização. O excesso da solução de $CaCl_2$ foi removido com o auxílio de uma pipeta e as crioplacas foram secas em papel de filtro (*Whatman* n°1).

As crioplacas com os ápices aderidos (Figura 6d) foram colocadas em contato com 2 mL da solução de *loading* por 20 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, o material foi exposto às soluções de vitrificação PVS2 ou PVS3 por diferentes períodos (0, 15, 30, 45, 60, 90 ou 120 minutos). A exposição à PVS2 foi realizada à temperatura ambiente e a 0°C. Todas as outras etapas foram realizadas somente à temperatura ambiente.

As crioplacas foram transferidas para criotubos de 2 mL completamente preenchidos por nitrogênio líquido onde permaneceram por 15 minutos.

O protocolo de vitrificação utilizando as crioplacas está esquematizado na Figura 8.

Figura 8 - Esquema da metodologia utilizada para os experimentos de v-crioplacas.



Fonte:Ilustração de Adriana Lanziotti, 2014.

3.3.4 Reaquecimento e recuperação

Para o reaquecimento do material submetido à técnica de vitrificação, os criotubos foram retirados do nitrogênio líquido e imediatamente transferidos para o banho-maria a 39°C por 2 minutos. Em seguida, a solução de vitrificação foi substituída nos criotubos por uma solução de alta osmolaridade, solução de *unloading* (meio MS com 1,2 M sacarose). O material foi mantido nesta solução por 20 minutos à temperatura ambiente.

No caso do material submetido à criopreservação em v-crioplacas, o reaquecimento foi realizado através da imersão direta das crioplacas na solução de alta osmolaridade (*unloading*), à temperatura ambiente, onde permaneceu por 20 minutos.

Após essas etapas, os ápices foram secos em papel de filtro (*Whatman* n°1) e transferidos para placas de Petri contendo 30 mL de meio MS sólido suplementado com 0,5 $mg.L^{-1}$ da citocinina BAP. Os ápices foram dispostos nas placas sobre uma folha de papel de filtro e mantidos no escuro por 24 horas. Após o período de 24 horas no escuro, o material foi transferido para frascos de vidro (45x35 mm) contendo 20 mL de meio de cultura com igual composição, porém sem o uso de papel de filtro. Os frascos foram mantidos sob luz difusa (20 µmol m^{-2} s^{-1}) por uma semana e, em seguida, transferidos para uma maior intensidade luminosa (45 µmol m^{-2} s^{-1}).

Para avaliar o efeito da exposição do material às soluções crioprotetoras, ápices expostos às soluções PVS2 e PVS3, mas não resfriados, foram lavados em solução de *unloading* e inoculados em meio de recuperação (MS + 0,5 $mg.L^{-1}$ de BAP) onde permaneceram por 30 dias. Após este período, o material foi transferido para meio MS0 e mantido nas mesmas condições físicas descritas anteriormente.

A eficiência do processo de criopreservação após o reaquecimento e reinoculação dos ápices em meio de recuperação foi avaliada através da aferição das porcentagens de sobrevivência e recuperação. A sobrevivência (ápices que apresentavam coloração verde e início de crescimento) foi aferida quatro semanas após o resfriamento em NL, enquanto que a recuperação (percentual de plantas completas regeneradas), foi aferida oito semanas após o resfriamento.

3.4 **Análise estatística**

Nos experimentos de vitrificação foram utilizados 30 ápices por tratamento em três repetições com 10 ápices, enquanto que para os ensaios de V-Crioplacas foram utilizados 60 ápices por tratamento em três repetições de 20 ápices. Os dados foram apresentados nas tabelas como média ± erro padrão.

Para a análise estatística, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade ($p \leq 0,05$). As análises foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism 5.00.

4 **RESULTADOS**

4.1 **Seleção dos explantes**

A viabilidade do uso de ápices caulinares de 1,5 mm nos ensaios de criopreservação foi comprovada após um mês de cultivo *in vitro* em meio MS0 ou em MS acrescido de 0,5 $mg.L^{-1}$ de BAP, quando foram alcançadas frequências de regeneração de 100% a partir de ápices inoculados nas duas condições de cultura. Os ápices regeneraram plantas inteiras, com aspecto fenotípico normal, após um mês em cultivo (Figura 9a). A suplementação do meio de cultura com BAP resultou em multibrotações (Tabela 1; Figura 9b).

A regeneração a partir de explantes nodais não ultrapassou os valores de 40% e 50% para aqueles cultivados em MS0 e em MS enriquecido com 0,5 $mg.\ L^{-1}$ de BAP, respectivamente (Tabela 1). As partes aéreas formadas a partir dos segmentos nodais inoculados em MS0 apresentaram tamanho reduzido e ausência de raiz (Figura 9c). A adição de BAP ao meio de cultura resultou em multibrotações a partir dos explantes nodais (Figura 9d), conforme também observado com os ápices caulinares. Porém, embora tenha ocorrido o desenvolvimento de partes aéreas, não houve a formação de plantas completas. Além disso, as folhas formadas apresentam um menor desenvolvimento e coloração de verde claro a amarelado (Figura 9d).

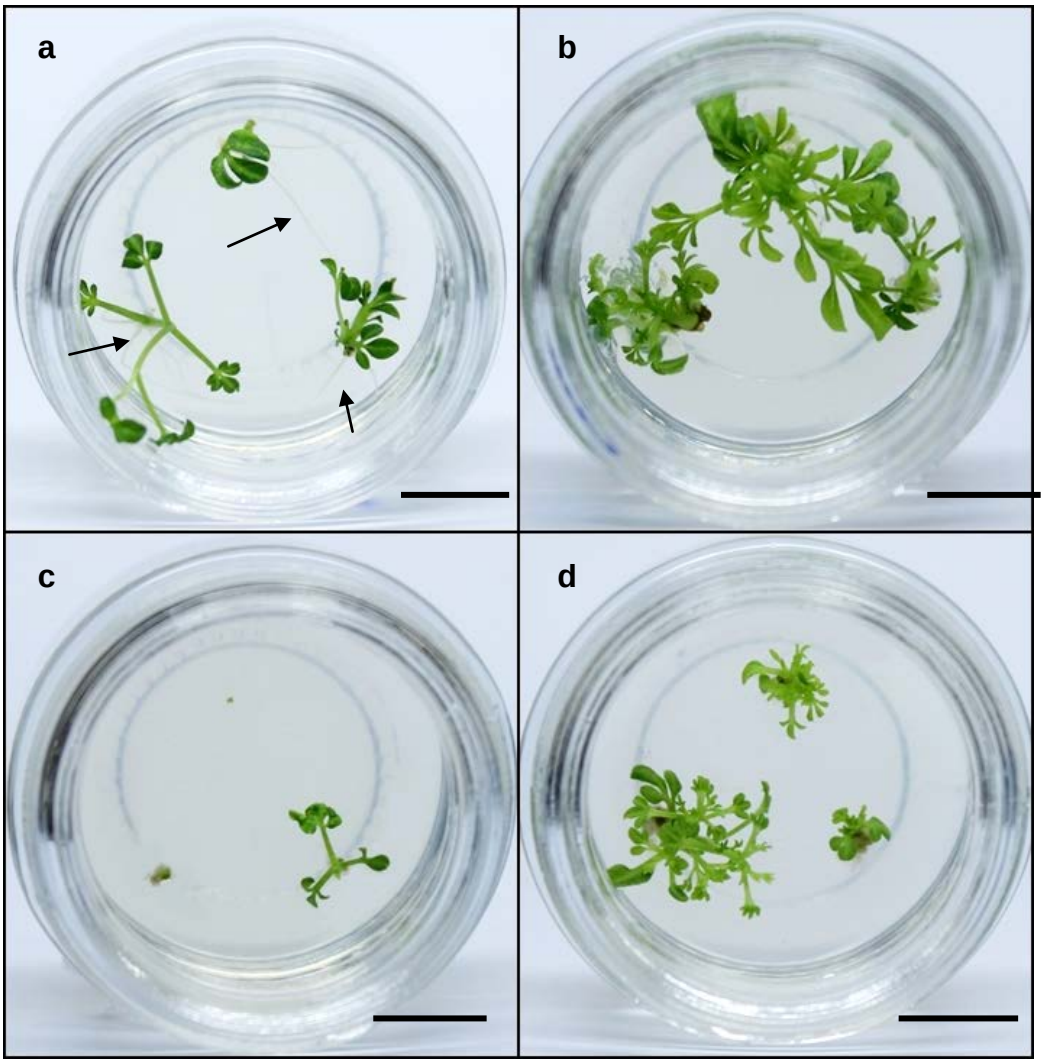
Explantes caulinares das regiões internodais, não apresentaram resposta morfogênica, independentemente do tamanho utilizado. Estes explantes, com o tempo em cultura, apresentaram necrose e foram descartados.

Tabela 1 - Taxa de regeneração e número médio de brotos formados a partir de ápices caulinares e segmentos nodais de *C. spinosa*, após 30 dias em cultivo.

Explante	MS0		MS + 0,5 mg. L^{-1} BAP	
	Regeneração (%)	N° médio de brotos/ explante	Regeneração (%)	N° médio de brotos/ explante
Ápice caulinar	100	1,3±0,1	100	4,0±0,6
Segmento nodal	40	0,5±0,2	50	1,2±0,5

Nota: Os dados representam média ± erro padrão.

Figura 9 - Plantas regeneradas a partir de ápices caulinares e segmentos nodais de *C. spinosa,* após um mês de cultivo *in vitro.*



Legenda: (a) Ápices caulinares em meio MS0; (b) Ápices caulinares em meio MS + 0,5 mg. L^{-1} de BAP; (c) Segmentos nodais em meio MS0; (d) Segmentos nodais em meio MS + 0,5 mg. L^{-1} de BAP.Nota: As setas indicam raízes. Barras = 1cm
Fonte: A autora, 2015..

4.2 **Pré-cultivo e *Loading***

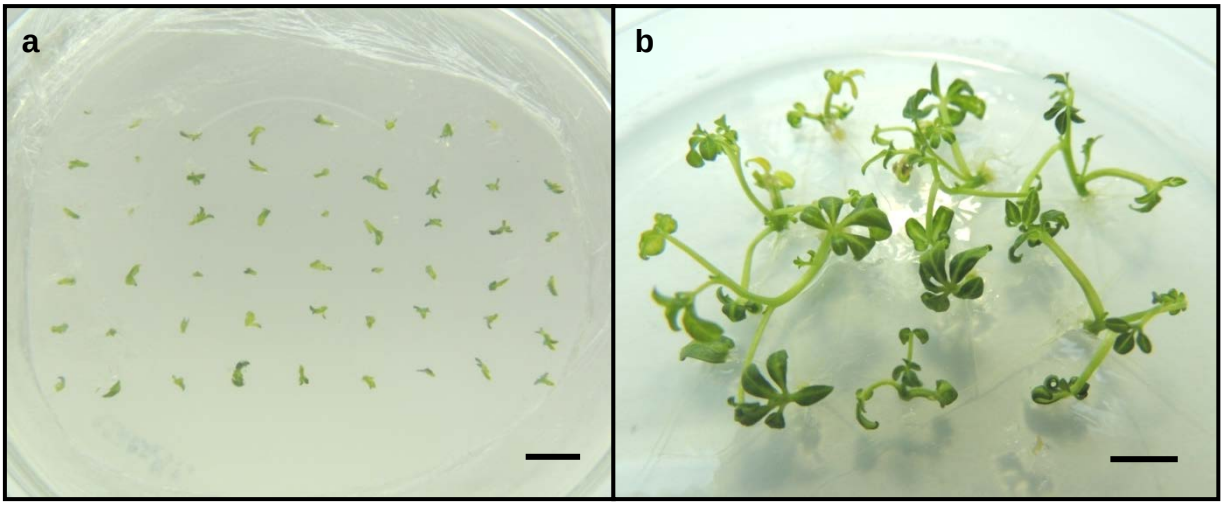
O cultivo de ápices caulinares de *C. spinosa* em meio MS enriquecido com altas concentrações de sacarose acarretou na redução gradativa do conteúdo hídrico dos ápices (Tabela 2). A exposição do material a diferentes concentrações de sacarose por 24 horas resultou na manutenção de valores de teor hídrico de 74,49% na concentração de 0,25 M até 56,66% para a maior concentração de sacarose (0,7 M). Quando os ápices foram mantidos na presença de concentrações crescentes de sacarose (0,25M - 0,5 M) por 48 horas, a desidratação contínua resultou em teor hídrico residual de 55,40%. Ápices submetidos ao tratamento por 24 horas em meios contendo 0,09 M, 0,25 M e 0,3 M de sacarose, assim como aqueles submetidos ao tratamento em concentrações crescentes por 48 horas, não oxidaram e apresentaram desenvolvimento normal, sendo obtidas taxas de regeneração de 100%. Essa resposta pode ser observada na Figura 10 que representa o tratamento com 0,3 M de sacarose após dois (Figura 10a) e 30 dias (Figura 10b). A exposição dos ápices por 24 horas aos meios com 0,5 M e 0,7 M de sacarose resultou na redução das taxas de regeneração para 80% e 60%, respectivamente (Tabela 2).

Em função dos resultados obtidos, foram selecionados para a etapa de pré-cultivo, duas condições que resultaram em níveis distintos de desidratação, mas que apresentaram taxas de regeneração de 100%. A manutenção do material por 24 horas na concentração de 0,3 M de sacarose, condição frequentemente usada em trabalhos de criopreservação de ápices, e a manutenção do material por 48 horas em concentrações crescentes de sacarose (0,25M - 0,5 M), na qual foi alcançada a maior redução de conteúdo.

Tabela 2 - Teor hídrico e taxa de regeneração de ápices caulinares de *C. spinosa* cultivados em meio MS0 contendo diferentes concentrações de sacarose.

Concentração de Sacarose	Teor hídrico (%)	Taxa de regeneração (%)
0,09 M	93,25	100
0,25 M	74,49	100
0,3 M	71,24	100
0,5 M	62,27	80
0,7 M	56,66	60
0,25 M + 0,5 M	55,40	100

Figura 10 - Ápices caulinares de *C. spinosa* após tratamento por 24 horas em meio MS0 enriquecido com 0,3 M de sacarose.

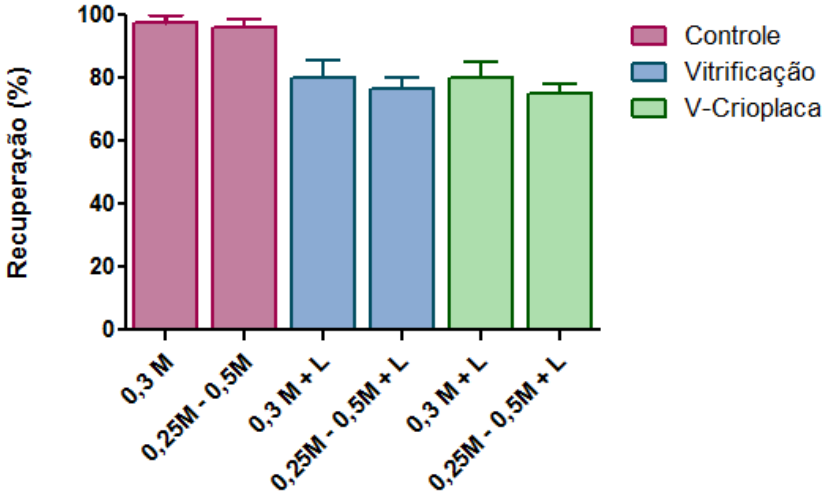


Legenda: Ápices transferidos para meio MS0 padrão (a) após 2 dias e (b) após 30 dias do tratamento.
Nota: Barras = 1 cm.
Fonte: A autora, 2015.

O efeito das etapas de pré-cultivo e de exposição ao *loading* foram avaliadas quanto à capacidade de recuperação dos ápices (Figura 11). A associação do pré-cultivo com a exposição ao *loading*, tanto para ápices imersos diretamente na solução de *loading* (técnica de vitrificação), como para aqueles previamente aderidos à crioplaca (técnica de v-crioplaca), resultou em taxas de recuperação de 75% a 80% (Figura 11). Entretanto, para os ápices imersos em NL a realização

apenas destas duas etapas não se mostrou suficiente para a recuperação do material, demonstrando a necessidade de exposição dos ápices às soluções de vitrificação para alcançar níveis de desidratação eficientes para a criopreservação.

Figura 11 - Efeito das etapas de pré-cultivo e exposição ao *loading* na recuperação de ápices caulinares de *C. spinosa* antes da imersão em NL.



4.3 **Vitrificação**

4.3.1 Tratamentos com PVS2

Ápices não resfriados que foram expostos à PVS2 na temperatura de 25°C (Tabela 3), não apresentaram diferenças significativas nos valores alcançados para a sobrevivência, assim como para a recuperação, independentemente do pré-tratamento aplicado, para a maior parte dos tratamentos avaliados. De um modo geral, esses parâmetros apresentaram taxas médias de 80% e 60%, respectivamente. Apenas a exposição à solução crioprotetora pelo maior tempo testado (60 minutos) acarretou na redução da sobrevivência e recuperação,

principalmente quando os ápices foram submetidos ao pré-cultivo em concentrações crescentes de sacarose.

Para os materiais que foram imersos em NL, maiores valores de sobrevivência (30%) e recuperação (26,6%) foram obtidos após pré-cultivo em meio com 0,3 M de sacarose e exposição à PVS2 por 30 minutos (Tabela 3). Entretanto, ao avaliar a recuperação em todas as condições testadas, foi possível constatar que ápices pré-cultivados em concentrações crescentes de sacarose (0,25 - 0,50 M) foram responsivos após o reaquecimento, para todos os tempos de exposição à solução crioprotetora. Embora nos tratamentos aplicando este protocolo de pré-cultivo os percentuais de recuperação não tenham sido superiores a 23%, eles não diferiram significativamente da maior taxa obtida. Já no pré-cultivo em meio com 0,3 M de sacarose, apenas a 15 e 30 minutos de exposição ocorreu recuperação do material (Tabela 3).

Tabela 3 - Criopreservação de ápices caulinares de *C. spinosa* através da técnica de vitrificação utilizando a solução crioprotetora PVS2 a 25°C.

Pré-cultivo (MS + sacarose)	**Tempo de exposição à PVS2 (min)**	**Sobrevivência (%)**		**Recuperação (%)**	
		- NL	**+ NL**	**- NL**	**+ NL**
0,3 M	0	80,0±5,7^{ab}	0^{d}	80,0±5,7^{a}	*
	15	86,6±8,8^{a}	16,6±3,3^{ab}	66,6±8,8^{ab}	16,6±3,3^{ab}
	30	90,0±5,7^{a}	30,0±5,7^{a}	63,3±6,6^{ab}	26,6±6,6^{a}
	45	93,3±6,6^{a}	3,3±3,3^{c}	50,0±10,0^{ab}	0^{c}
	60	86,6±8,8^{a}	10,0±0,0^{b}	43,3±12,0^{ab}	0^{c}
0,25 - 0,50 M	0	76,6±3,3^{ab}	0^{d}	76,6±3,3^{a}	*
	15	96,6±3,3^{a}	16,6±6,6^{ab}	76,6±8,8^{a}	16,6±6,6^{ab}
	30	90,0±10,0^{a}	26,6±12^{a}	70,0±5,7^{a}	23,3±8,8^{a}
	45	73,3±8,8^{ab}	26,6±6,6^{a}	63,3±6,6^{ab}	13,3±3,3^{ab}
	60	53,3±14,5^{b}	6,6±3,3^{c}	30,0±5,7^{b}	6,6±3,3^{b}

Nota:Os dados representam média ± erro padrão; Letras iguais na mesma coluna indicam não haver diferença significativa entre os tratamentos ($p \leq 0,05$); * Não houve sobrevivência na etapa anterior

A exposição dos ápices à solução PVS2 na temperatura de 0°C (Tabela 4) resultou em menores valores de sobrevivência e recuperação do material não resfriado, quando aplicado o pré-cultivo em meio com concentrações crescentes de sacarose, em comparação ao tratamento em 0,3 M.

A redução da temperatura de exposição à PVS2 se mostrou menos eficiente para a criopreservação dos ápices de *C. spinosa* pela técnica de vitrificação (Tabela 4). Nos ápices pré-tratados em meio com 0,3 M de sacarose a recuperação não ultrapassou 3% em todos os tempos de exposição à PVS2. Já para os materiais submetidos ao pré-tratamento em concentrações crescentes de sacarose, a recuperação ocorreu apenas nos maiores tempos de exposição ao crioprotetor (45 e 60 minutos), sendo alcançadas taxas de 13% e 20%, respectivamente.

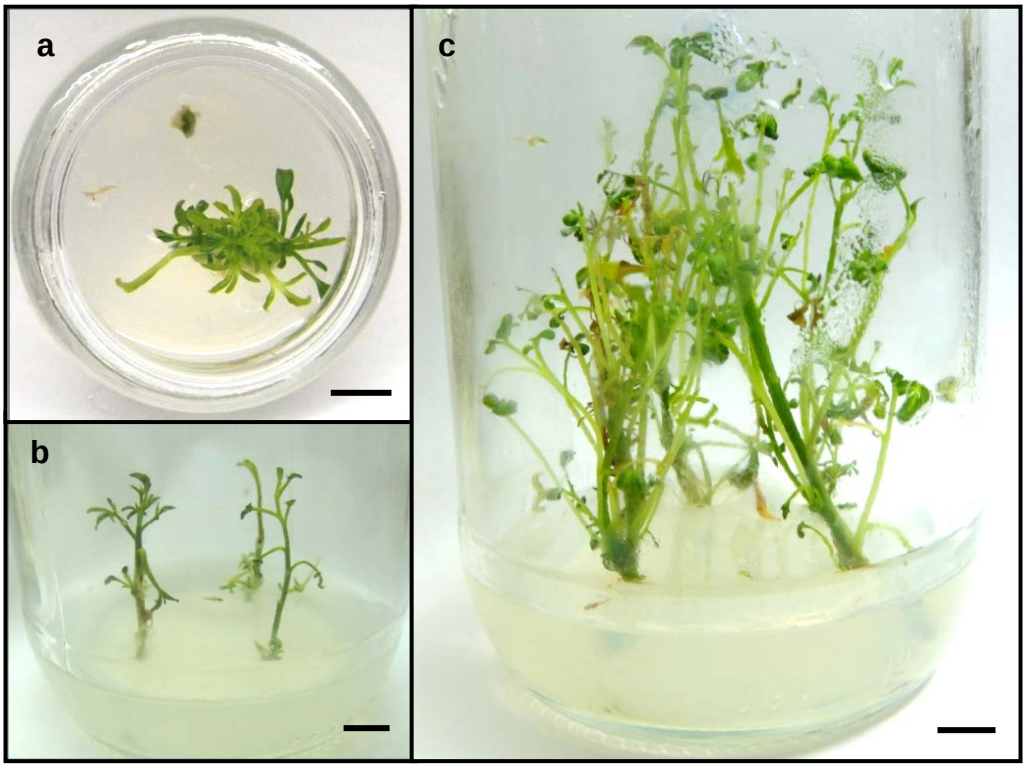
Tabela 4 - Criopreservação de ápices caulinares de *C. spinosa* através da técnica de vitrificação utilizando a solução crioprotetora PVS2 a 0°C.

Pré-cultivo (MS + sacarose)	**Tempo de exposição à PVS2 (min)**	**Sobrevivência (%)**		**Recuperação (%)**	
		- NL	**+ NL**	**- NL**	**+ NL**
0,3 M	0	80,0±5,7^{a}	0^{d}	80,0±5,7^{a}	*
	15	83,3±8,8^{a}	10,0±10,0^{b}	60,0±11,5^{ab}	3,3±3,3^{b}
	30	86,3±8,8^{a}	20,0±10,0^{a}	70,0±11,5^{a}	3,3±3,3^{b}
	45	80,0±5,7^{a}	13,3±3,3^{ab}	70,0±5,7^{a}	3,3±3,3^{b}
	60	76,6±8,8^{a}	13,3±3,3^{ab}	63,3±12,0^{ab}	3,3±3,3^{b}
0,25 - 0,50 M	0	76,6±3,3^{a}	0^{d}	76,6±3,3^{a}	*
	15	56,6±8,8^{b}	3,3±3,3^{c}	43,3±8,8^{b}	0^{c}
	30	56,6±8,8^{b}	3,3±3,3^{c}	40,0±5,7^{b}	0^{c}
	45	63,3±3,3^{b}	13,3±3,3^{ab}	46,6±3,3^{b}	10,0±5,7^{a}
	60	73,3±3,3^{a}	36,6±8,8^{a}	63,3±3,3^{ab}	13,3±6,6^{a}

Nota: Os dados representam média ± erro padrão.; Letras iguais na mesma coluna indicam não haver diferença significativa entre os tratamentos ($p \leq 0,05$); * Não houve sobrevivência na etapa anterior

A temperatura de exposição à solução crioprotetora influenciou o número de plantas formadas a partir dos ápices recuperados, assim como o seu desenvolvimento. Enquanto ápices criopreservados oriundos do tratamento a 0°C deram origem a apenas uma planta, a formação de mais de uma planta por ápice foi verificada no material submetido ao tratamento com a solução crioprotetora a 25°C (Tabela 5). Ápices pré-cultivados em 0,3M e expostos à PVS2 por 15 e 30 minutos originaram multibrotações (Figura 12a), com a produção de um número médio de 7 brotos por ápice no tempo de exposição à solução crioprotetora por 30 minutos (Tabela 5). A formação de multibrotações continuou quando os brotos recuperados foram isolados e subcultivados para meio MS0, para alongamento e enraizamento (Figura 12b), resultando na proliferação *in vitro* de um grande número de plantas quatro meses após a criopreservação (Figura 12c). Já ápices expostos à PVS2 por 15 minutos, apresentaram número médio de 4,2 brotos por ápice (Tabela 5)

Figura 12 - Ápices caulinares de *C. spinosa* pré-cultivados com 0,3 M de sacarose e criopreservados através da técnica de vitrificação com exposição a PVS2 (25ºC) por 30 minutos antes da imersão em NL.



Legenda:(a) Desenvolvimento de brotos após 45 dias da recuperação; (b) Brotos isolados subcultivados em meio MS0; (c) Multibrotações a partir de plantas oriundas da criopreservação, após 120 dias da recuperação. Nota:Barras = 1 cm.
Fonte: A autora, 2015.

Tabela 5 - Número médio de brotos formados após a criopreservação de ápices caulinares de *C. spinosa* utilizando a técnica de vitrificação com PVS2.

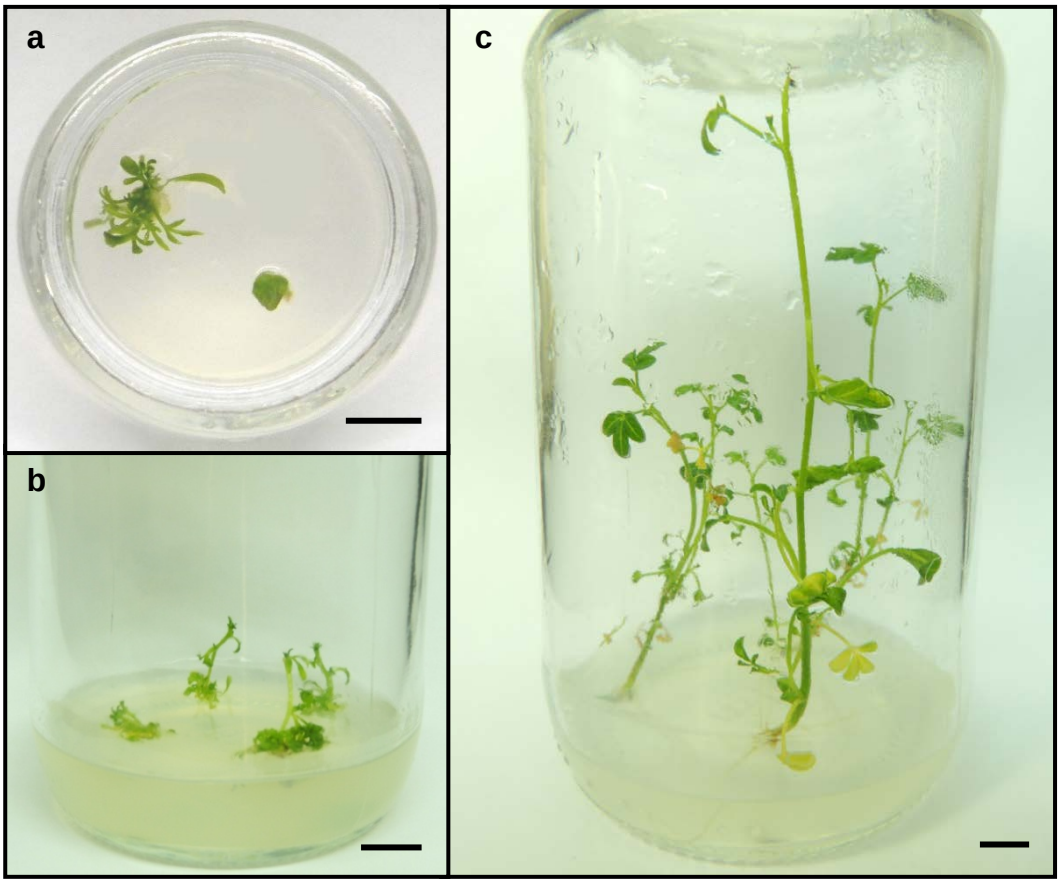
Pré-cultivo (MS + sacarose)	Temperatura de exposição à PVS2	Tempo de exposição à PVS2 (min)	Número médio de brotos/ápice	
			- NL	+ NL
0,3 M	25°C	0	1,2±0,1[b]	*
		15	2,6±0,2[a]	4,2±0,9[b]
		30	2,5±0,2[a]	7,0±0,4[a]
		45	1,8±0,2[ab]	**
		60	1,7±0,2[ab]	**
0,25 - 0,50 M	25°C	0	1,1±0,1[b]	*
		15	1,2±0,1[b]	1,0±0,0[c]
		30	1,2±0,1[b]	1,0±0,0[c]
		45	1,2±0,1[b]	1,0±0,0[c]
		60	1,1±0,1[b]	1,0±0,0[c]
0,3 M	0°C	0	1,1±0,1[b]	*
		15	1,3±0,1[b]	1,8±0,3[c]
		30	1,0±0,0[b]	1,3±0,1[c]
		45	1,0±0,0[b]	1,0±0,0[c]
		60	1,0±0,0[b]	1,0±0,0[c]
0,25 - 0,50 M	0°C	0	1,1±0,1[b]	*
		15	1,2±0,1[b]	**
		30	1,1±0,1[b]	**
		45	1,3±0,1[b]	1,0±0,0[c]
		60	1,2±0,1[b]	1,0±0,0[c]

Nota: Os dados representam média ± erro padrão; Letras iguais na mesma coluna indicam não haver diferença significativa entre os tratamentos ($p \leq 0,05$); * Não houve sobrevivência; ** Não houve recuperação

Os tratamentos visando à criopreservação também influenciaram no desenvolvimento das plantas após a etapa de recuperação. Algumas plantas obtidas a partir de ápices pré-cultivados em 0,25-0,5 M e expostos por 15 ou 30 minutos ao PVS2 a 25°C, apresentavam aspecto hiperhídrico, com ausência de alongamento e enraizamento. Também foram formados pequenos aglomerados de brotos com aspecto hiperhídrico (Figura 13a). Esses brotos foram individualizados e transferidos para meio MS0 (Figura 13b). O subcultivo para meio sem suplementação hormonal possibilitou o enraizamento, resultando no desenvolvimento de plantas completas.

Ao longo dos subcultivos, o aspecto hiperhídrico foi sendo atenuado, de modo que, após o terceiro mês, as plantas já apresentavam um aspecto fenotípico normal (Figura 13c).

Figura 13 - Ápices caulinares de *C. spinosa* pré-cultivados com 0,25 M - 0,5 M de sacarose e expostos à PVS2 (25 °C) por 15 min antes da imersão em NL.

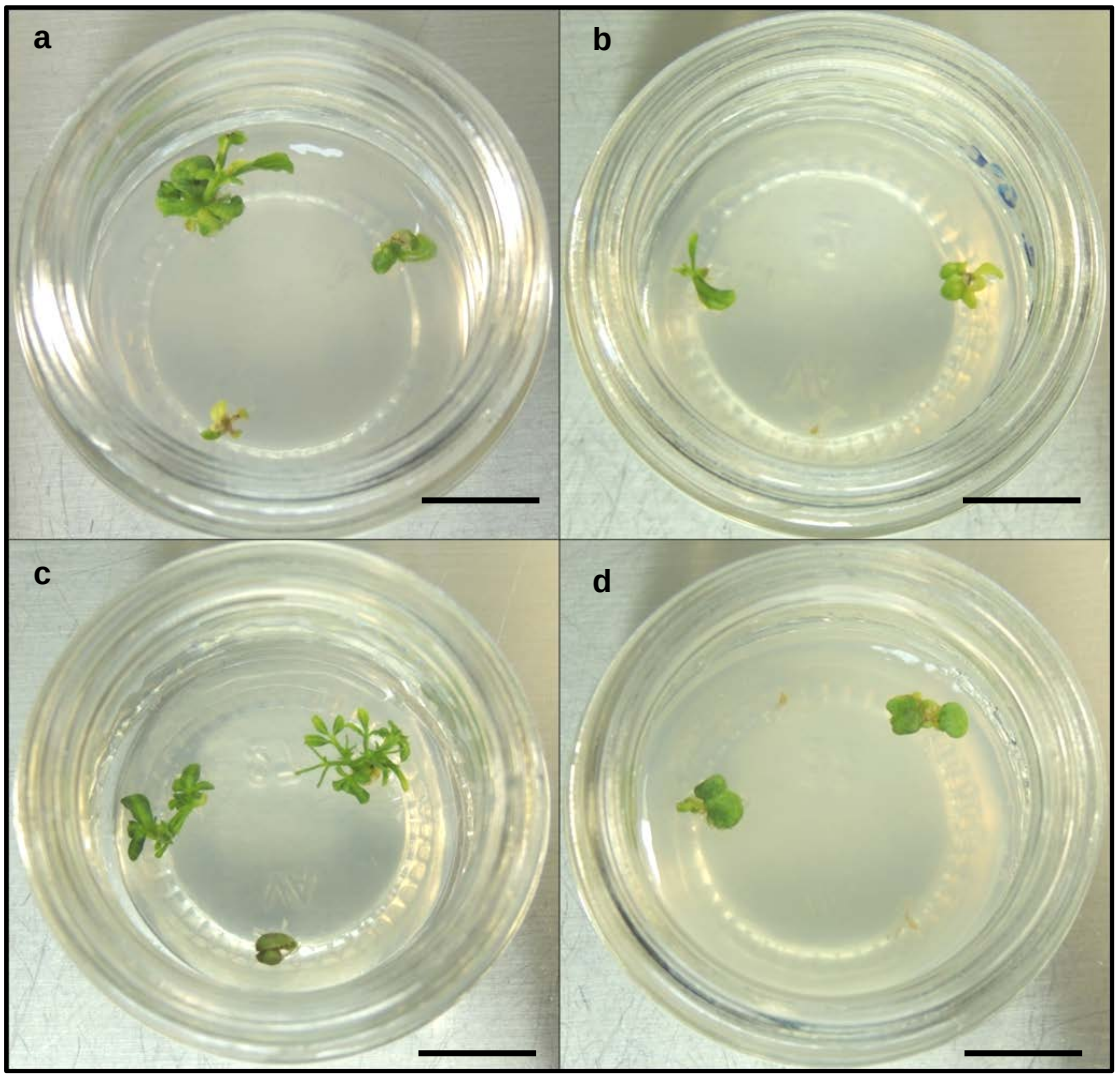


Legenda: (a)- Desenvolvimento de brotos 30 dias após a recuperação; (b)- Brotos com aspecto hiperhídrico isolados e transferidos para meio MS0 60 dias após da recuperação; (c)- Plantas oriundas de ápices criopreservados, após 120 dias da recuperação.
NotaBarras = 1 cm.
Fonte: A autora, 2015.

Ainda que tenham sido alcançados menores percentuais de recuperação com o uso do PVS2 a 0°C, os ápices expostos a esta condição de tratamento apresentaram recuperação mais rápida em relação àqueles tratados a 25°C. Três semanas após o início da etapa de recuperação, já era possível observar o desenvolvimento de primórdios foliares tanto nos ápices não resfriados (Figura 14a e 14c), quanto naqueles imersos em NL (Figura 14b e 14d). Esta mesma resposta só

foi observada nos ápices submetidos ao PVS2 a 25°C durante a quarta semana de recuperação. Entretanto, não foi observada a formação de plantas a partir do material oriundo dos tratamentos a 0°C. Os ápices desenvolveram apenas primórdios foliares que apresentavam um aspecto hiperhídrico.

Figura 14 - Resposta morfogênica de ápices caulinares de *C. spinosa* criopreservados pela técnica de vitrificação após 21 dias da exposição à PVS2 a 0°C.



Legenda: (a) Exposição por 15 minutos e sem imersão em NL; (b) Exposição por 15 minutos e imersão em NL; (c) Exposição por 45 minutos e sem imersão em NL; (d) Exposição por 15 minutos e imersão em NL. Barras = 1 cm.
Fonte: A autora, 2015.

4.3.2 Tratamentos com PVS3

Ápices não resfriados tratados com PVS3 apresentaram taxas de sobrevivência de 66,6% a 76,6%, independentemente do pré-cultivo utilizado

(Tabela 6). Entretanto, a exposição a concentrações crescentes de sacarose resultou em menores valores percentuais de recuperação. Esta resposta está relacionada à associação do pré-cultivo com a exposição à PVS3, uma vez que os ápices submetidos apenas ao pré-cultivo, sem exposição à solução crioprotetora apresentaram valores de recuperação iguais àqueles observados para a sobrevivência.

Para os ápices imersos em NL, não foram observadas diferenças significativas nas taxas de sobrevivência para a maior parte dos diferentes tratamentos. Entretanto, para a recuperação após a criopreservação, a exposição por 45 minutos à solução crioprotetora resultou nas maiores taxas de recuperação (20%) nas duas condições de pré-cultivo aplicadas. Resultados semelhantes foram também alcançados pelo material submetido ao pré-cultivo em concentrações crescentes de sacarose e exposto ao PVS3 por 30 minutos (Tabela 6).

Tabela 6 - Criopreservação de ápices caulinares de *C. spinosa* através da técnica de vitrificação utilizando a solução crioprotetora PVS3 a 25°C.

Pré-cultivo (MS + sacarose)	**Tempo de exposição à PVS3 (min)**	**Sobrevivência (%)**		**Recuperação (%)**	
		- NL	**+ NL**	**- NL**	**+ NL**
0,3 M	0	80,0±5,7^{a}	0^{c}	80,0±5,7^{a}	*
	15	70,0±10,0^{a}	10,0±5,7^{ab}	70,0±10,0^{a}	6,6±3,3^{b}
	30	70,0±10,0^{a}	26,6±12,0^{a}	70,0±10,0^{a}	20,0±5,7^{a}
	45	73,3±13,3^{a}	33,3±8,8^{a}	73,3±13,3^{a}	20,0±0,0^{a}
	60	76,6±12,0^{a}	10,0±5,7^{ab}	76,3±12,0^{a}	6,6±6,6^{b}
0,25 - 0,50 M	0	76,6±3,3^{a}	0^{c}	76,6±3,3^{a}	*
	15	66,6±6,6^{a}	6,6±3,3^{b}	56,6±8,8^{ab}	3,3±3,3^{b}
	30	70,0±10,0^{a}	13,3±8,8^{ab}	63,3±8,8^{ab}	6,6±6,6^{b}
	45	70,0±10,0^{a}	26,6±6,6^{a}	53,3±3,3^{b}	20,0±5,7^{a}
	60	76,6±12,0^{a}	26,6±3,3^{a}	53,3±8,8^{b}	6,6±3,3^{b}

Nota: Os dados representam média ± erro padrão; Letras iguais na mesma coluna indicam não haver diferença significativa entre os tratamentos ($p \leq 0,05$); * Não houve sobrevivência na etapa anterior

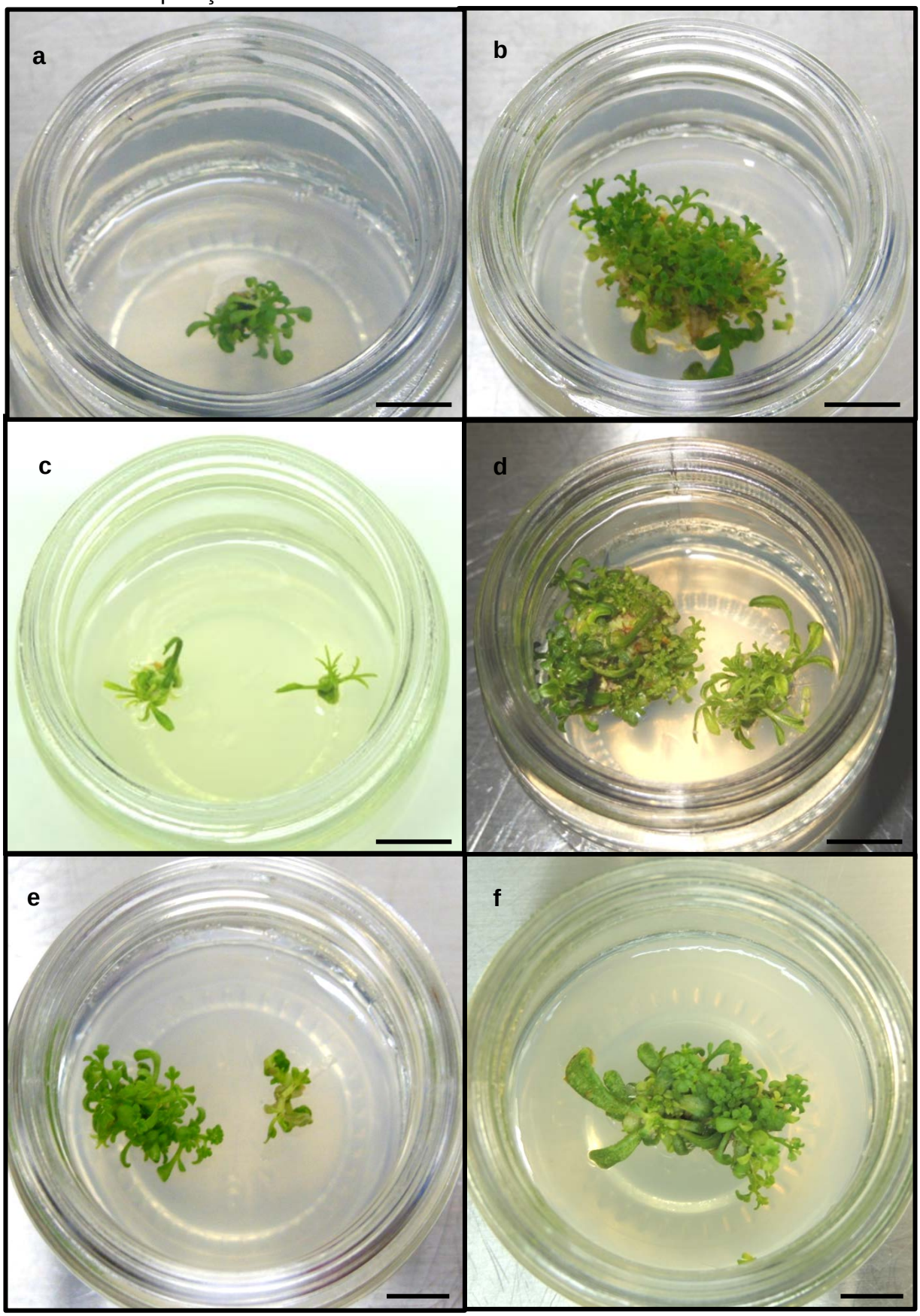
Os ápices criopreservados, principalmente aqueles submetidos ao pré-tratamento em 0,3 M de sacarose, após serem inoculados em meio de recuperação, deram origem a pequenos aglomerados de brotos, a maioria com aspecto hiperídrico, independentemente do tempo de exposição à PVS3. Esta resposta foi observada tanto após 30 dias (Figuras 15a, 15c e 15e), como após 60 dias (Figuras 15b, 15d e 15f) da exposição à solução de vitrificação. Esses brotos foram individualizados, sendo observada a formação de 1,6 - 4,0 brotos por ápice recuperado (Tabela 7). Embora os brotos tenham sido transferidos para meio MS0, não foi observado o enraizamento e alongamento ao longo do tempo de cultura. Já nos protocolos onde foi aplicado o pré-cultivo em concentrações crescentes de sacarose, os ápices recuperados, em sua maioria, deram origem a apenas um broto, não sendo observado o enraizamento.

Tabela 7 - Número médio de brotos formados após a criopreservação de ápices caulinares de *C. spinosa* utilizando a técnica de vitrificação com PVS3.

Pré-cultivo (MS + sacarose)	**Tempo de exposição à PVS3 (min)**	**Número médio de brotos/ápice**	
		-NL	**+ NL**
0,3 M	0	1,0±0,0[a]	*
	15	1,4±0,1[a]	4,0±2,0[a]
	30	1,6±0,1[a]	1,6±0,3[ab]
	45	1,6±0,1[a]	2,5±0,7[ab]
	60	1,5±0,1[a]	4,0±2,0[a]
0,25 - 0,50 M	0	1,1±0,1[a]	*
	15	1,3±0,1[a]	1,0±0,0[b]
	30	1,3±0,1[a]	1,0±0,0[b]
	45	1,4±0,1[a]	1,3±0,2[b]
	60	1,3±0,1[a]	1,0±0,0[b]

Os dados representam média ± erro padrão.
Letras iguais na mesma coluna indicam não haver diferença significativa entre os tratamentos ($p \leq 0,05$).
* Não houve sobrevivência na etapa anterior

Figura 15 - Resposta morfogênica em ápices caulinares de *C. spinosa* pré-cultivados com 0,3 M de sacarose e criopreservados pela técnica de vitrificação com exposição à PVS3.



Legenda: (a) 30 dias após a exposição por 15 minutos; (b) 60 dias após a exposição por 15 min; (c) 30 dias após a exposição por 45 minutos; (d) 60 dias após a exposição por 45 min; (e) 30 dias após a exposição por 60 minutos; (f) 60 dias após a exposição por 60 min. Barras = 1 cm.

Fonte: A autora, 2015.

4.4 **V-Crioplacas**

4.4.1 Tratamentos com PVS2

Ápices submetidos ao tratamento com PVS2 a 25°C, mas não resfriados, apresentaram taxas de sobrevivência que variaram de 73% a 90% nos tratamentos com a solução crioprotetora por até 60 minutos. Entretanto, a exposição por maiores tempos (90 e 120 minutos), acarretou na redução do percentual de sobrevivência (53% a 63%). Estes resultados foram observados independentemente do pré-cultivo utilizado (Tabela 8).

Quando os ápices foram transferidos para meio de recuperação, a exposição à PVS2 foi a condição que mais afetou a resposta *in vitro*. Ápices não imersos em NL, pré-cultivados em sacarose pelos dois protocolos empregados, mas não expostos à PVS2, mostraram valores de recuperação semelhantes àqueles observados para a sobrevivência, enquanto que a exposição ao crioprotetor resultou na redução da recuperação.

O tratamento de pré-cultivo influenciou a sobrevivência e a recuperação dos ápices que foram imersos em NL. O pré-cultivo na presença de 0,3 M de sacarose foi mais eficiente para a criopreservação. Ápices submetidos a este pré-tratamento, e a seguir expostos à PVS2 por tempos de 30 a 120 minutos, alcançaram taxas de sobrevivência que não diferiram entre si, sendo o valor máximo (50%) obtido após 30 minutos de exposição à solução crioprotetora. Resultados semelhantes foram obtidos no pré-tratamento com concentrações crescentes de sacarose apenas no tempo de exposição à PVS2 por 60 minutos (Tabela 8).

A recuperação a partir dos ápices criopreservados ocorreu para todos os tempos de exposição à PVS2 nos ensaios realizados com o uso do pré-tratamento em solução de 0,3 M de sacarose. Entretanto, para os experimentos com pré-cultivo em concentrações crescentes do açúcar, esta resposta só foi observada para os tempos de exposição de 45 e 60 minutos (Tabela 8).

A maior taxa de recuperação alcançada nos ensaios em v-crioplacas na presença de PVS2 a 25°C foi obtida no tempo de exposição de 30 minutos (40%) no pré-tratamento em solução de 0,3 M de sacarose. Este resultado não apresentou

diferença estatística com relação aos tratamentos com tempos de exposição de 45 e 60 minutos à solução crioprotetora, independentemente do protocolo de pré-cultivo utilizado.

Tabela 8 - Criopreservação de ápices caulinares de *C. spinosa* através da técnica de vitrificação em crioplacas (v-crioplacas) utilizando a solução crioprotetora PVS2 a 25°C.

Pré-cultivo (MS + sacarose)	**Tempo de exposição à PVS2 (min)**	**Sobrevivência (%)**		**Recuperação (%)**	
		- NL	**+ NL**	**- NL**	**+ NL**
0,3 M	0	80,0±5,0^{a}	0^{d}	80,0±5,0^{a}	*
	15	90,0±0,0^{a}	6,6±3,3^{c}	63,3±3,3^{ab}	6,6±3,3^{c}
	30	90,0±0,0^{a}	50,0±5,7^{a}	76,6±3,3^{a}	40,0±5,7^{a}
	45	73,3±12,0^{ab}	46,6±13,3^{a}	63,3±6,6^{ab}	36,5±8,8^{a}
	60	86,6±3,3^{a}	33,3±16,6^{a}	63,3±3,3^{ab}	23,3±6,6^{ab}
	90	63,3±3,3^{ab}	46,6±13,3^{a}	53,3±3,3^{b}	13,3±3,3^{b}
	120	63,3±3,3^{ab}	33,3±16,6^{a}	53,3±3,3^{b}	10,0±5,7^{bc}
0,25 - 0,50 M	0	76,6±3,3^{ab}	0^{d}	76,6±3,3^{a}	*
	15	90,0±5,7^{a}	3,3±3,3^{c}	70,0±5,7^{a}	0^{d}
	30	86,6±8,8^{a}	3,3±3,3^{c}	60,0±5,7^{ab}	0^{d}
	45	90,0±5,7^{a}	23,3±3,3^{b}	66,6±3,3^{ab}	20,0±0,0^{ab}
	60	90,0±5,7^{a}	30,0±5,7^{ab}	53,3±8,8^{b}	23,3±8,8^{ab}
	90	63,3±3,3^{ab}	6,6±3,3^{c}	53,3±3,3^{b}	0^{d}
	120	53,3±8,8^{b}	3,3±3,3^{c}	13,3±3,3^{c}	0^{d}

Nota:Os dados representam média ± erro padrão; Letras iguais na mesma coluna indicam não haver diferença significativa entre os tratamentos ($p \leq 0,05$); * Não houve sobrevivência na etapa anterior

A exposição de ápices não resfriados ao PVS2 na temperatura de 0°C resultou em taxas de sobrevivência de 76% a 96% quando consideradas as duas condições de pré-cultivo. Para a recuperação, não foram verificadas diferenças significativas entre os materiais mantidos na presença de 0,3 M de sacarose para todos os tempos de exposição à PVS2, com exceção do tratamento por 90 minutos. Esses resultados também não diferiram daqueles obtidos após o pré-cultivo em

concentrações crescentes de sacarose e exposição à solução de vitrificação por 90 min. Esses tratamentos resultaram em taxas de recuperação de 73% a 80% (Tabela 9).

Em relação ao material imerso em NL, a redução na temperatura de exposição à PVS2 se mostrou uma condição importante para a eficiência do processo de criopreservação (Tabela 9). O aumento do tempo de exposição à solução crioprotetora, resultou nas melhores respostas tanto de sobrevivência como de recuperação. Ápices pré-tratados em concentrações crescentes de sacarose e mantidos na solução crioprotetora pelos maiores tempos de exposição, apresentaram os valores mais expressivos para os parâmetros avaliados. Na etapa de recuperação, os ápices expostos por 45 (Figura 16a), 60 (Figura 16b), 90 (Figura 16c), 120 (Figura 16d) minutos ao PVS2, originaram plantas completas com aspecto fenotípico normal um mês após a criopreservação. A exposição à PVS2 por 90 minutos se mostrou o protocolo mais eficiente para a criopreservação dos ápices caulinares de *C. spinosa*, sendo obtidas as maiores taxas de sobrevivência (86%) e recuperação (70%), quando comparado aos demais protocolos empregados no presente estudo.

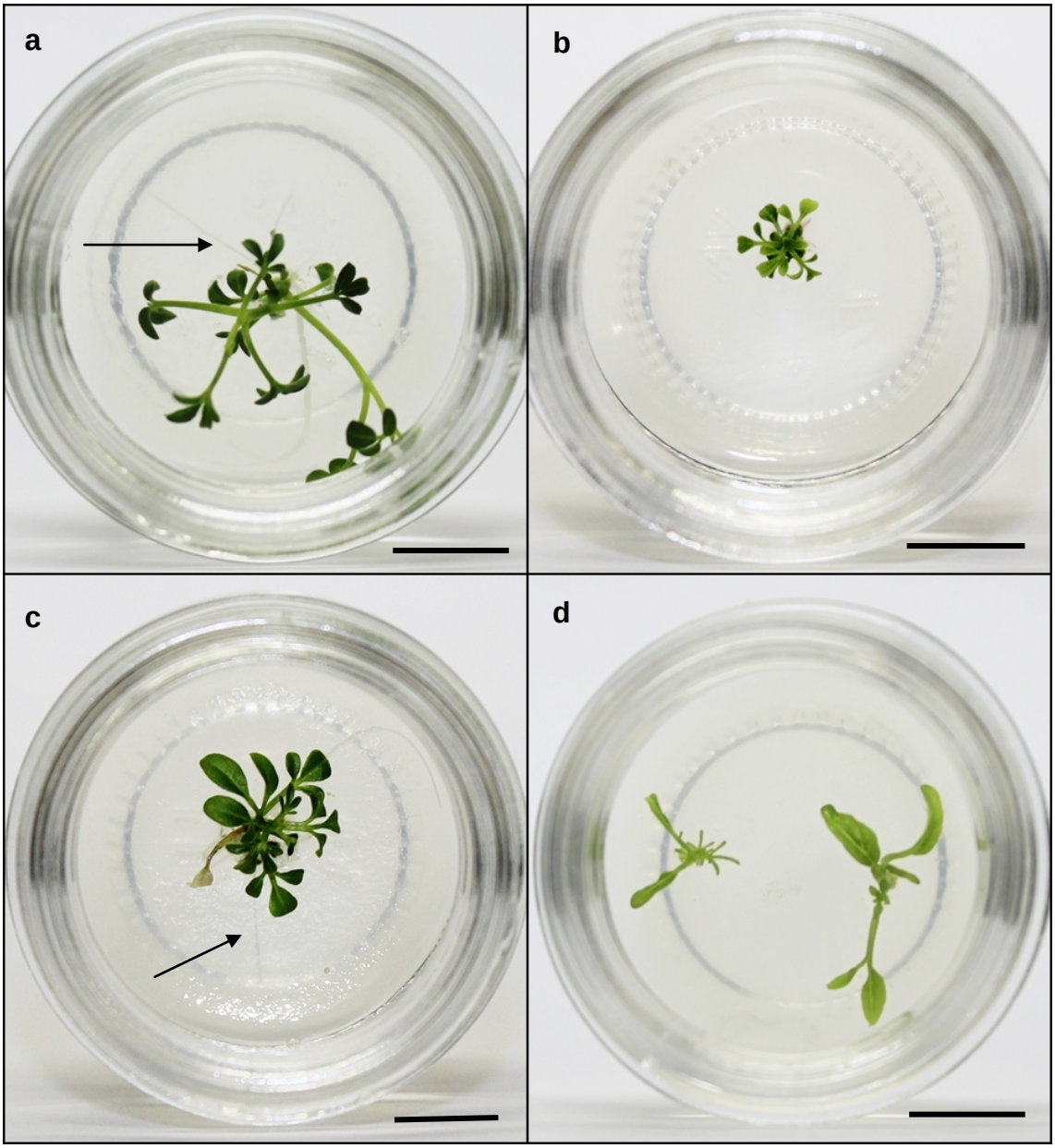
Para o material pré-tratado em solução de 0,3 M de sacarose, as maiores taxas de sobrevivência e recuperação também foram alcançadas nos maiores tempos de exposição à solução crioprotetora (Tabela 9).

Tabela 9 - Criopreservação de ápices caulinares de *C. spinosa* através da técnica de vitrificação em crioplacas (v-crioplacas) utilizando a solução crioprotetora PVS2 a 0°C.

Pré-cultivo (MS + sacarose)	**Tempo de exposição à PVS2 (min)**	**Sobrevivência (%)**		**Recuperação (%)**	
		- NL	**+ NL**	**- NL**	**+ NL**
0,3 M	0	80,0±5,0[a]	0[f]	80,0±5,0[a]	*
	15	96,6±3,3[a]	3,3±3,3[e]	73,3±6,6[ab]	0[e]
	30	93,3±3,3[a]	6,6±3,3[e]	73,3±6,6[ab]	3,3±3,3[d]
	45	93,3±3,3[a]	13,3±8,8[de]	80,0±5,7[a]	6,6±3,3[d]
	60	83,3±8,8[a]	16,6±3,3[d]	73,3±6,6[ab]	13,3±3,3[d]
	90	83,3±8,8[a]	43,3±8,8[c]	66,6±3,3[b]	23,3±3,3[c]
	120	90,0±5,7[a]	63,3±6,6[b]	70,0±0,0[ab]	43,3±6,6[b]
0,25 - 0,50 M	0	76,6±6,6[a]	0[f]	76,6±6,6[ab]	*
	15	76,6±6,6[a]	0[f]	50,0±0,0[c]	*
	30	76,6±6,6[a]	0[f]	50,0±0,0[c]	*
	45	83,3±3,3[a]	40,0±10,0[c]	63,3±3,3[b]	30,0±5,7[c]
	60	83,3±3,3[a]	36,6±6,6[c]	66,6±3,3[b]	26,6±6,6[c]
	90	96,6±3,3[a]	86,6±3,3[a]	80,0±0,0[a]	70,0±5,7[a]
	120	90,0±5,7[a]	63,3±6,6[b]	63,3±3,3[b]	50,0±5,7[b]

Nota:Os dados representam média ± erro padrão; Letras iguais na mesma coluna indicam não haver diferença significativa entre os tratamentos ($p \leq 0,05$); * Não houve sobrevivência na etapa anterior

Figura 16 - Resposta morfogênica de ápices caulinares de *C. spinosa* pré-cultivados com 0,25 M - 0,5 M de sacarose e criopreservados pela técnica de v-crioplacas, após 30 dias de exposição à solução PVS2 a 0°C.



Legenda: Exposição por: (a) 45; (b) 60; (c) 90; (d) 120minutos. As setas indicam a presença de raízes. Barras = 1 cm.
Fonte: A autora, 2015.

Assim como observado para a técnica de vitrificação, nos ensaios em v-crioplacas, a temperatura de tratamento com a solução crioprotetora influenciou no número e no desenvolvimento das plantas. Os maiores números de brotos por ápices recuperados foram obtidos a partir do material expostos à solução de PVS2 a 0°C. Ápices pré-tratados em concentrações crescentes de sacarose e expostos à

solução crioprotetora pelos maiores tempos de exposição deram origem de 2,5 a 3,4 brotos/ápice (Tabela 10).

Ápices mantidos em PVS2 a 25°C e imersos em NL originaram pequenos brotos com aspecto fenotípico normal. Entretanto, as plantas não alongaram, mesmo após dois meses de cultivo em meio MS0.

Plantas obtidas a partir de ápices criopreservados na presença de PVS2 a 0°C apresentaram rápido desenvolvimento, de forma que 15 dias após o recuperação já era possível observar a formação de primórdios foliares e após 30 dias, já era evidenciado o desenvolvimento de raízes. Sessenta dias do processo de criopreservação, plantas oriundas dos tratamentos com a solução crioprotetora por 45 (Figura 17a), 60 (Figura 17b), 90 (Figura 17c) e 120 minutos (Figura 17d) apresentavam aspecto fenotípico normal e mantiveram a capacidade de multiplicação ao longo do tempo em cultura (Figura 18).

Tabela 10 - Número médio de brotos formados após a criopreservação de ápices caulinares de *C. spinosa* utilizando a técnica de v-crioplacas com PVS2.

Pré-cultivo (MS + sacarose)	**Temperatura de exposição à PVS2**	**Tempo de exposição à PVS2 (min)**	**Número médio de brotos/ápice**	
			-NL	**+ NL**
0,3 M	25 °C	0	1,2±0,1[b]	*
		15	1,3±0,1[b]	1,0±0,0[b]
		30	1,6±0,1[b]	1,2±0,1[b]
		45	1,4±0,1[b]	1,6±0,1[b]
		60	1,7±0,1[b]	1,0±0,0[b]
		90	1,7±0,1[b]	1,0±0,0[b]
		120	1,0±0,0[b]	1,0±0,0[b]
0,25 - 0,50 M	25 °C	0	1,1±0,1[b]	*
		15	1,1±0,1[b]	**
		30	1,3±0,1[b]	**
		45	1,1±0,1[b]	1,0±0,0[b]
		60	1,3±0,1[b]	1,2±0,3[b]
		90	1,4±0,8[b]	**
		120	1,0±0,0[b]	**
0,3 M	0 °C	0	1,2±0,1[b]	*
		15	1,3±0,1[b]	**
		30	1,2±0,1[b]	1,0±0,0[b]
		45	1,5±0,1[b]	1,0±0,0[b]
		60	1,3±0,1[b]	1,5±0,2[b]
		90	1,4±0,1[b]	1,7±0,4[b]
		120	1,1±0,1[b]	1,4±0,1[b]
0,25 - 0,50 M	0 °C	0	1,1±0,1[b]	*
		15	2,9±0,5[a]	*
		30	2,0±0,3[ab]	*
		45	1,6±0,1[b]	2,5±0,3[ab]
		60	1,5±0,5[b]	3,4±0,6[a]
		90	3,0±0,5[a]	3,3±0,4[a]
		120	3,0±0,2[a]	2,6±0,3[ab]

Nota: Os dados representam média ± erro padrão;Letras iguais na mesma coluna indicam não haver diferença significativa entre os tratamentos ($p \leq 0,05$); * Não houve sobrevivência; ** Não houve recuperação

Figura 17 - Plantas regeneradas a partir de ápices caulinares pré-cultivados com 0,25 M - 0,5 M de sacarose e criopreservados pela técnica de v-crioplacas, após 60 dias de exposição à PVS2 a 0°C.

Legenda: Exposição por: (a) 45; (b) 60; (c) 90; (d) 120minutos. As setas indicam a presença de raízes. Barras = 1cm.
Fonte: A autora, 2015.

Figura 18 - Plantas regeneradas a partir de ápices caulinares pré-cultivados com com 0,25 M - 0,5 M de sacarose e criopreservados pela técnica de v-crioplacas com exposição à PVS2 a 0°C por 90 minutos, após seis

Legenda: Barra = 1 cm.
Fonte: A autora, 2015.

4.4.2 Tratamento com PVS3

Ápices expostos à PVS3, mas não resfriados, apresentaram valores de sobrevivência na faixa de 90%, independentemente do pré-tratamento utilizado. Entretanto, o aumento do tempo de exposição à solução crioprotetora acarretou na redução das taxas de sobrevivência (Tabela 11). A transferência dos ápices para meio MS acrescido de BAP, resultou em taxas de recuperação que não diferiram entre si, à exceção dos experimentos com exposição à PVS3 por 120 minutos.

Quando os ápices foram imersos em NL, não foram observadas diferenças significativas com relação aos dois pré-tratamentos. A exposição à PVS3 por tempos intermediários resultou em maiores valores de sobrevivência, com destaque para ápices pré-tratados em concentrações crescentes de sacarose e expostos por 90 minutos à solução crioprotetora, que resultou em 50% de sobrevivência. Resposta similar foi verificada durante a recuperação, onde os ápices criopreservados pelo mesmo tratamento citado anteriormente alcançaram a maior taxa de recuperação (26%), embora sem diferença significativa com relação aos tratamentos por 30 a 60 minutos com a solução crioprotetora (Tabela 11).

Ápices criopreservados em PVS3 não produziram multibrotações, sendo obtidos valores máximos de 1,7 brotos/ápice (Tabela 12). Embora as plantas desenvolvidas a partir desses ápices tenham apresentado um aspecto fenotípico normal (Figura 19), mostraram menor desenvolvimento quando comparadas àquelas regeneradas de ápices submetidos aos tratamentos na presença de PVS2.

Tabela 11 - Criopreservação de ápices caulinares de *C. spinosa* através da técnica de vitrificação em crioplacas (v-crioplacas) utilizando a solução crioprotetora PVS3.

Pré-cultivo (MS + sacarose)	**Tempo de exposição à PVS3 (min)**	**Sobrevivência (%)**		**Recuperação (%)**	
		- NL	**+ NL**	**- NL**	**+ NL**
0,3 M	0	80,0±5,0^{ab}	0^{d}	80,0±5,0^{a}	*
	15	96,6±3,3^{a}	0^{d}	66,6±3,3^{ab}	*
	30	96,6±3,3^{a}	33,3±8,8^{ab}	70,0±5,7^{a}	16,6±6,6^{ab}
	45	96,6±3,3^{a}	16,6±3,3^{b}	66,6±3,3^{ab}	13,3±3,3^{ab}
	60	96,6±3,3^{a}	36,6±12,0^{ab}	73,3±6,6^{a}	23,3±3,3^{a}
	90	90,0±0,0^{a}	23,3±3,3^{b}	63,3±3,3^{ab}	13,3±3,3^{ab}
	120	63,3±8,8^{b}	16,6±3,3^{b}	46,6±8,8^{b}	6,6±3,3^{b}
0,25 - 0,50 M	0	76,67±3,3^{ab}	0^{d}	76,67±3,3^{ab}	*
	15	90,0±5,7^{a}	0^{d}	60,0±5,7^{ab}	*
	30	90,0±5,7^{a}	6,6±3,3^{c}	66,6±3,3^{ab}	0^{c}
	45	90,0±5,7^{a}	16,6±12^{bc}	70,0±5,7^{a}	13,3±3,3^{ab}
	60	90,0±5,7^{a}	30,0±5,7^{ab}	53,3±8,8^{ab}	20,0±5,5^{a}
	90	63,3±3,3^{b}	50,0±10,0^{a}	63,3±3,3^{ab}	26,6±3,3^{a}
	120	53,3±8,8^{b}	6,6±3,3^{c}	30,0±10,0^{b}	3,3±3,3^{b}

Nota: Os dados representam média ± erro padrão; Letras iguais na mesma coluna indicam não haver diferença significativa entre os tratamentos ($p \leq 0,05$); * Não houve sobrevivência na etapa anterior

Tabela 12 - Número médio de brotos formados após a criopreservação de ápices caulinares de *C. spinosa* utilizando a técnica de v-crioplacas com PVS3.

Pré-cultivo (MS + sacarose)	**Tempo de exposição à PVS3 (min)**	**Número médio de brotos/ápice**	
		-NL	**+ NL**
0,3 M	0	1,2±0,1[a]	*
	15	1,2±0,1[a]	*
	30	1,4±0,1[a]	1,2±0,2[a]
	45	1,3±0,1[a]	1,0±0,0[a]
	60	1,4±0,1[a]	1,5±0,2[a]
	90	1,2±0,1[a]	1,0±0,0[a]
	120	1,2±0,1[a]	1,0±0,0[a]
0,25 - 0,50 M	0	1,2±0,1[a]	*
	15	1,6±0,1[a]	*
	30	1,7±0,1[a]	**
	45	1,6±0,1[a]	1,0±0,0[a]
	60	1,6±0,1[a]	1,3±0,2[a]
	90	1,2±0,1[a]	1,1±0,1[a]
	120	1,2±0,1[a]	1,5±0,5[a]

Nota: Os dados representam média ± erro padrão; Letras iguais na mesma coluna indicam não haver diferença significativa entre os tratamentos ($p \leq 0,05$); * Não houve sobrevivência; ** Não houve recuperação

Figura 19 - Plantas regeneradas a partir de ápices caulinares pré-cultivados com 0,25 M - 0,5 M de sacarose e criopreservados pela técnica de v-crioplacas com exposição à PVS3 por 90 minutos, após três meses de cultivo *in vitro*

Legenda: Barra = 1 cm.
Fonte: A autora, 2015.

5 **DISCUSSÃO**

Neste trabalho foram investigados métodos visando à criopreservação de plantas propagadas *in vitro* de *C. spinosa.* O presente trabalho representa o primeiro estudo envolvendo a criopreservação de ápices caulinares em espécies da família Cleomaceae, na qual apenas a espécie *Cleome rosea* já havia sido investigada com este objetivo, porém utilizando segmentos radiculares (CORDEIRO; SIMÕES-GURGEL; ALBARELLO, *no prelo*).

Inicialmente, diferentes partes da planta foram avaliadas quanto à sua capacidade de regenerar a partir de pequenos fragmentos. A necessidade em utilizar estruturas de tamanho reduzido, se deve ao fato de que em menores quantidades de tecido vegetal, as etapas de desidratação, resfriamento e reaquecimento ocorrem mais rápida e uniformemente (CARVALHO; VIDAL, 2003). Para *C. spinosa*, apenas o uso de ápices caulinares permitiu que fossem alcançadas altas porcentagens de regeneração. Ápices são estruturas muito utilizadas em estudos de criopreservação devido ao tamanho reduzido de suas células, uniformidade, alto grau de divisão celular, presença de vacúolos pequenos e alta taxa nucleocitoplasmática (ENGELMANN, 2010). Essas características meristemáticas lhes conferem maior tolerância à desidratação em relação às células altamente diferenciadas, aumentando o seu potencial de recuperação após a criopreservação (ENGELMANN, 2010).

Considerando os outros tipos de explantes avaliados, também foi observado o desenvolvimento de partes aéreas em segmentos nodais, mas esta resposta foi alcançada apenas em 50% dos explantes. Na maior parte não houve o desenvolvimento de raízes e as poucas plantas formadas apresentaram tamanho reduzido. Explantes nodais também têm sido utilizados de forma eficiente na conservação *in vitro* via criopreservação para algumas espécies (MARKOVIC et al., 2014; MERHY et al, 2014; NIINO et al., 2013; RAY; BHATTACHARYA, 2008; SANAYAIMA et al., 2006). Entretanto, características como maior grau de diferenciação celular e maior tamanho podem dificultar a penetração homogênea das soluções crioprotetoras nesses materiais, dificultando a recuperação após a imersão em NL (RAY; BHATTACHARYA, 2008).

Segmentos internodais de *C. spinosa* ao serem cultivados a partir de explantes de tamanhos inferiores a 0,5 cm não apresentaram qualquer tipo de resposta morfogênica, embora estudos anteriores tenham constatado o potencial morfogenético deste material para a micropropagação (ALBARELLO et al., 2006) e a calogênese (ALBARELLO et al., 2007).

Uma vez selecionado o tipo de explante mais adequado aos estudos de criopreservação, foram estabelecidas culturas de microestacas para a padronização da idade dos ápices caulinares, que foram utilizados com 2-3 semanas de cultivo *in vitro.* A influência da idade dos ápices na recuperação após a criopreservação foi avaliada por Charoensub e colaboradores (2003). Nesses estudos, ápices de aipim com cerca de duas semanas de cultivo alcançaram maiores taxas de recuperação quando comparados a ápices cultivados por períodos de tempo maiores. Em função destes resultados, os autores sugeriram o cultivo de microestacas durante período de tempo pré-determinado para servirem como fontes de explantes, a fim de obter um material fisiologicamente mais homogêneo e, desta forma, minimizar o efeito do tempo em cultura na recuperação do material após a criopreservação. O efeito do tempo de cultivo das microestacas na recuperação de ápices criopreservados também foi avaliado para *Vitis vinifera* (MARKOVIĆ et al., 2012). Foram utilizados no estudo tempos de cultura que variavam de 4 à 16 semanas. Após as etapas da criopreservação, os menores tempos de cultivo foram aqueles que resultaram em maiores valores de recuperação, sendo então apontado como os mais indicados para a espécie. Muitos estudos atuais envolvendo a técnica de crioplacas têm utilizado as culturas de microestacas para a obtenção de explantes mais uniformes (RAFIQUE et al., 2015; SEKIZAWA et al., 2011; SYLVESTRE-ENGELMANN; ENGELMANN, 2015; YAMAMOTO et al., 2012a, 2012b; YAMAMOTO et al., 2015).

As técnicas de criopreservação avaliadas no presente trabalho baseiam-se no processo de vitrificação, sendo necessária a otimização dos processos de desidratação para que ocorra a remoção do máximo possível da água disponível nas células, a fim de evitar a formação de cristais de gelo durante o resfriamento (SANTOS, 2000). Desta forma, a capacidade de o material utilizado em reduzir o seu teor hídrico foi investigada a partir da exposição ao pré-cultivo com diferentes concentrações de sacarose.

O pré-cultivo com substâncias crioprotetoras, em geral, é realizado em meios de cultura enriquecidos com altas concentrações de açúcares, como sacarose,

manitol, glicose, entre outros. Entretanto, o efeito de dissacarídeos como a sacarose parece ser mais efetivo devido à sua dissociação em monossacarídeos (HELLIOT et al., 2003).

Os açúcares desempenham um papel muito importante na aquisição de resistência à desidratação no processo de criopreservação, conferindo à célula vegetal maior tolerância ao resfriamento (SAKAI; HIRAI; NIINO, 2008; PANIS et al., 2002). O efeito protetor dos açúcares solúveis como a sacarose sobre as membranas celulares se deve à capacidade destas substâncias em formar pontes de hidrogênio com as regiões polares dos fosfolipídios das membranas e, desta forma, substituírem as moléculas de água, mantendo a estabilidade dessas estruturas mesmo após a desidratação (HELLIOT et al., 2003; ZHU et al., 2006).

A manutenção do material vegetal em soluções com altas concentrações de açúcares leva a alterações fisiológicas nas células que irão permitir maior adaptação ao estresse osmótico. Ramon e colaboradores (2002) reportaram o aumento nos níveis de poliaminas durante a etapa de pré-cultivo em estudos com ápices de banana. Segundo os autores, as poliaminas atuariam como captadores de espécies reativas de oxigênio (EROs), protegendo as membranas celulares da oxidação. Do mesmo modo, ocorre aumento nos níveis do aminoácido prolina, que também exerce um papel importante na proteção contra as EROs (SUZUKI et al., 2006). A elevação nos níveis deste aminoácido nas plantas sobre estresse hídrico visa balancear o aumento da osmolaridade extracelular e, desta forma, auxiliar na estabilização das proteínas (YOSHIBA et al., 1997). A relação entre ácidos graxos insaturados e saturados nas membranas celulares também sofre alteração durante o tratamento na presença de altas concentrações de açúcares, como observado para ápices de banana (RAMON et al., 2002). O aumento de ácidos graxos insaturados foi verificado nos tratamentos que resultaram em melhores respostas ao processo de criopreservação. Segundo Vandenbussche e colaboradores (1999) o aumento da insaturação dos ácidos graxos influencia a flexibilidade e a permeabilidade das membranas, assim como sua resistência a diferentes condições de estresse.

A partir da avaliação do teor hídrico dos ápices de *C. spinosa* incubados em diferentes concentrações de sacarose, foram selecionadas duas condições para serem avaliadas na etapa de pré-cultivo. A manutenção do material em presença de 0,3 M de sacarose por 24 horas e a exposição a concentrações crescentes de

sacarose (0,25M-0,50M) por um período total de 48 horas, resultaram em valores residuais de teor hídrico de 71,24% e 55,40%, respectivamente.

O pré-cultivo com 0,3 M de sacarose tem sido utilizado em muitos estudos envolvendo a criopreservação de diferentes espécies vegetais, tanto a partir de ápices caulinares (CHAROENSUB; HIRAI; SAKAI, 2004; CONDELLO et al., 2009; MARKOVIC et al., 2012; SAKAI; ENGELMANN, 2007; SAN-JOSÉ et al., 2013; SEKIZAWA et al., 2011; SYLVESTRE-ENGELMANN; ENGELMANN, 2015; YAMAMOTO et al., 2012a; YAMOTO et al., 2015), como com segmentos nodais (MATSUMOTO et al., 2014), raízes (JUNG et al., 2001; LAMBERT et al., 2009; XUE et al., 2008), embriões somáticos (FANG et al, 2008; VALLADARES et al., 2004) e culturas de calos (DANSO; FORD-LLYOD, 2008; SUBAIH; SHATNAWI; SHIBLI, 2007).

Contudo, muitas vezes o pré-cultivo realizado pela imersão do material em apenas uma solução contendo alta concentração de sacarose pode acarretar em efeitos deletérios ao material biológico (WANG et al., 2005). Sendo assim, os pré-cultivos com concentrações crescentes de sacarose podem ser aplicados com a finalidade de se obter uma desidratação mais lenta e gradual. Em *C. spinosa* ápices mantidos por 24 horas em solução contendo 0,7 M de sacarose alcançaram valores de teor hídrico similar àqueles obtidos com o tratamento em concentrações crescentes de sacarose (56%). Entretanto, a regeneração foi afetada pelo tratamento a 0,7 M, no qual foram alcançadas taxas de 60% de regeneração em comparação aos 100% obtidos quando aplicado o tratamento em concentrações crescentes. Quando expostos a uma concentração mais baixa de sacarose, os ápices são adaptados a estresses osmóticos intermediários para em seguida serem submetidos à desidratação com concentrações maiores (KIM; LEE, 2012). O pré-tratamento com concentrações crescentes de sacarose já foi utilizado para otimizar os resultados da criopreservação em diversas espécies (KALITA et al., 2012; KIM; LEE, 2012; SUZUKI et al., 2006; WANG et al., 2005), inclusive para segmentos radiculares de *Cleome rosea* (CORDEIRO; SIMÕES-GURGEL; ALBARELLO, *no prelo*).

Nos protocolos estabelecidos no presente trabalho, optou-se pelo uso da solução de *loading* após o pré-cultivo em todos os tratamentos avaliados, tendo em vista o seu papel na indução de tolerância à desidratação (SAKAI; HIRAI; NIINO, 2008). A exposição do material vegetal às soluções de vitrificação sem uma etapa

de osmoproteção pode causar danos em virtude do estresse osmótico. Muitos trabalhos sugerem que o tratamento prévio com uma solução de crioprotetores de concentração intermediária, pode minimizar esses danos (PENNYCOOKE; TOWILL, 2001; SAKAI, 2004). Sendo assim, o uso da solução de *loading* antes da desidratação com as soluções de vitrificação vem sendo relatado como um importante fator para obter recuperação após o armazenamento em NL (CANO-CASTILLO; CASAS, 2012; CHAEROENSUB; HIRAI; SAKAI, 2004; MATSUMOTO, 2002; VIDAL et al., 2005; WANG et al., 2002).

O tipo de técnica de criopreservação empregada influenciou diretamente a sobrevivência e recuperação dos ápices após a imersão em NL. As maiores taxas de recuperação foram obtidas com o uso da técnica de v-crioplacas. O uso das crioplacas de alumínio aumentou cerca de 40% a recuperação de ápices criopreservados, em comparação aos resultados obtidos pela vitrificação. Da mesma forma, a utilização das crioplacas aumentou a eficiência dos protocolos de criopreservação em ápices de batata, chegando a obter taxas de 100% de recuperação (YAMAMOTO et al., 2015). A eficácia do método também vem sendo reportada em outras espécies vegetais, tais como *Tanacetum cinerariifolium* (YAMAMOTO et al., 2011), *Dianthus caryophyllus* (SEKIZAWA et al., 2011), cultivares de morango (YAMAMOTO et al., 2012a), *Mentha* spp. (YAMAMOTO et al., 2012b), cultivares de cana-de-açúcar (RAFIQUE et al., 2015) e *Clinopodium odorum* (ENGELMANN-SYLVESTRE; ENGELMANN, 2015).

A obtenção de maiores percentuais de recuperação do material criopreservado pelo método de v-crioplacas vem sendo diretamente relacionada com o aumento da eficiência dos processos de resfriamento e reaquecimento, o qual ajuda a manter a integridade estrutural das células (HIRAI, 2011). No caso da técnica de vitrificação, em que os criotubos tampados e preenchidos com grandes volumes de solução crioprotetora são imersos em NL, são alcançadas taxas de resfriamento e reaquecimento de 100-200°C min^{-1} e 80-120°C min^{-1}, respectivamente (HIRAI, 2011; NIINO et al., 2013). Em contrapartida, devido à natureza metálica das crioplacas, a utilização de um pequeno volume de solução crioprotetora e ao contato direto com o NL, essas taxas podem alcançar 4000-5000°C min^{-1} e 3000-4500°C min^{-1}, respectivamente (NIINO et al., 2013; YAMAMOTO et al., 2011).

Outra vantagem das crioplacas diz respeito à facilidade de manipulação do material vegetal. A necessidade de utilização de materiais de tamanho muito reduzido aumenta o risco de ocorrência de lesões ou mesmo da perda dos explantes ao longo das etapas do processo. Além disso, a aderência à crioplaca confere maior precisão ao processo e garante que todos os explantes estejam em contato direto com as soluções utilizadas (*loading*, PVSs e *unloading*) (YAMAMOTO et al., 2011).

É importante destacar que, embora os ensaios de criopreservação com a técnica de v-crioplacas tenham resultado em maiores taxas de recuperação para ápices criopreservados de *C. spinosa*, o processo também foi alcançado com a aplicação da técnica de vitrificação. Descrita por Sakai, Kobayashi e Oiyama em 1990, esta técnica ainda é amplamente utilizada para criopreservar diferentes materiais vegetais, sobretudo ápices caulinares, já tendo sido estabelecidos protocolos para diversas espécies vegetais, incluindo tropicais (GOLMIRZAIE; PANTA, 2000; HASSAN; HAGGAG, 2013; PENNYCOOKE; TOWILL, 2000; ROCA et al., 2000; RUŽIĆ; VUJOVIĆ; CEROVIĆ, 2014; SANT; TAYLOR; TYAGI, 2006).

Os resultados obtidos pelos protocolos empregando as duas técnicas demonstraram que o tipo de solução de vitrificação, bem como a temperatura de tratamento e o tempo de exposição, foram fatores que influenciaram de forma significativa a sobrevivência e recuperação dos ápices de *C. spinosa*. As soluções de vitrificação são soluções aquosas de crioprotetores as quais contribuem para a manutenção do estado vítreo durante o resfriamento e reaquecimento, evitando a formação de cristais de gelo no interior das células (GONZALEZ-ARNAO et al., 2008). As soluções de vitrificação normalmente reúnem em sua constituição crioprotetores penetrantes e não-penetrantes que vão promover a desidratação dos materiais, protegendo-os de possíveis lesões teciduais que podem ocorrer devido à cristalização de moléculas de água (KIM et al., 2009). Dentre as soluções de vitrificação mais utilizadas destacam-se a PVS2 (SAKAI; KOBAYASHI; OIYAMA, 1990) e a PVS3 (NISHIZAWA et al., 1993), ambas utilizadas neste trabalho.

A PVS2 foi inicialmente descrita para a criopreservação de suspensões celulares de *Citrus sinensis*, porém, vem sendo aplicada com bastante sucesso na criopreservação de diversas espécies (SAKAI; ENGELMANN, 2007). O mecanismo de ação da PVS2 foi experimentalmente comprovado por Volk e Walters (2006). Os autores apontam que devido à natureza penetrante de alguns de seus componentes, a solução pode atuar na substituição da água celular, modificando o comportamento

de congelamento da água residual das células. Embora a maioria dos estudos utilize a PVS2, a solução PVS3, oiginalmente estabelecida para a criopreservação de suspensões celulares de *Asparagus officinalis*, também tem sido bastante empregada, principalmente como alternativa para a criopreservação de espécies sensíveis à PVS2 (KIM et al., 2009; SAKAI; ENGELMANN, 2007).

A presença de crioprotetores penetrantes na formulação da PVS2 como o DMSO e o etilinoglicol, confere maior toxicidade quando comparada à PVS3, que é constituída apenas por sacarose e glicerol (KIM et al., 2009). Devido ao seu alto peso molecular e viscosidade elevada, o glicerol apresenta baixo poder de penetração quando comparado ao DMSO e EG (KIM et al., 2009). Entretanto, um estudo comparativo entre a toxicidade dos componentes individuais das soluções crioprotetoras, realizado com ápices caulinares de *Mentha* spp., revelou que a taxa de difusão do glicerol é aumentada na presença de DMSO e EG (VOLK; HARRIS; ROTINDO, 2006). Quando utilizada a 0°C seus efeitos tóxicos podem ser minimizados, já que nessas condições a velocidade de penetração da PVS2 é diminuída devido ao bloqueio do poder de penetração do EG (SUZUKI et al., 2008; VOLK; HARRIS; ROTINDO, 2006).

O tipo de solução de vitrificação influenciou diretamente a resposta regenerativa de ápices de *C.spinosa* após a imersão em NL. Tendo em vista as duas técnicas empregadas, os maiores valores de recuperação obtidos foram através do uso de PVS2. De forma similar, quando comparados os efeitos da exposição à PVS2 e PVS3 na criopreservação de ápices caulinares de maçã, também foi evidenciado o efeito positivo da PVS2 na recuperação do material (HALMAGYI et al., 2010).

Estudos comparativos envolvendo o uso de PVS2 e PVS3 na criopreservação de ápices caulinares de cravo utilizando a técnica de v-crioplacas revelaram que não houve diferença significativa nas porcentagens de recuperação, independentemente da solução empregada (SEKIZAWA et al., 2011). Em contraste, ao comparar diferentes soluções de vitrificação, Lee e colaboradores (2011) evidenciaram que a desidratação com PVS2 gerou uma menor recuperação do que a obtida com PVS3, sendo essa resposta atribuída pelos autores à alta sensibilidade dos explantes testados aos constituintes da solução PVS2.

Quando as soluções de vitrificação foram usadas a 25°C, independentemente do protocolo de pré-cultivo avaliado, não ocorreram diferenças significativas na recuperação dos ápices criopreservados. Porém, para a PVS2 a 0°C, o pré-cultivo

em concentrações crescente de sacarose resultou em taxas de recuperação mais expressivas. Esses resultados foram observados nas duas técnicas de criopreservação empregadas e podem estar relacionados ao fato de que a 0°C a velocidade de penetração do PVS2 é reduzida quando comparado ao seu uso à temperatura ambiente. Esta redução na velocidade de penetração da PVS2 pode ter requerido um maior grau de desidratação prévio do material, o que foi verificado quando os ápices foram submetidos ao pré-tratamento em concentrações crescentes de sacarose.

Para encontrar um equilíbrio entre a ação crioprotetora e a toxicidade das soluções de vitrificação, é fundamental otimizar a etapa de desidratação, principalmente quanto à duração do tratamento (KIM et al., 2009). Nos estudos com ápices caulinares de *C. spinosa*, o aumento do tempo de exposição às soluções de vitrificação, quando empregadas a 25°C, resultou em menores valores de recuperação do material criopreservado. Em contrapartida, quando a solução de PVS2 foi usada a 0°C, o aumento do tempo de exposição foi benéfico à recuperação. Este fato demonstra a estreita relação entre a temperatura de tratamento com as PVSs e o tempo de exposição do material biológico a essas soluções.

Períodos de exposição mais longos à PVS2 a 25°C vêm sendo apontados em diversos estudos como um fator que afeta negativamente a sobrevivência e recuperação de ápices criopreservados (SAKAI; KOBAYASHI; OIYAMA, 1990; KALITA et al., 2012; MENON et al., 2012). Este fato pode ser atribuído ao efeito prejudicial causado pelo estresse osmótico ou excessiva toxicidade química desta solução que apresenta maior velocidade de penetração quando utilizada à temperatura ambiente (MENON et al., 2012). Em contrapartida, devido à menor velocidade de penetração em 0°C, o tratamento com PVS2 a esta temperatura geralmente requer maiores tempos de exposição a fim de reduzir o risco de formação intracelular de cristais de gelo (VOLK; HARRIS; ROTINDO, 2006). Entretanto, independentemente da temperatura de tratamento com a PVS2, é importante determinar de forma precisa o tempo ideal de exposição já que, mesmo quando usada a 0°C, o aumento do período de incubação pode acarretar na redução da recuperação do material criopreservado. Em seu estudo visando à criopreservação de *Capparis spinosa*, Shatnawi (2011) verificou que ápices caulinares expostos à PVS2 a 0°C por mais de 60 minutos apresentaram

significativa redução nas taxas de recuperação em ensaios realizados aplicando as técnicas de vitrificação e encapsulamento-vitrificação.

O tempo de exposição à solução de PVS3 também influenciou na recuperação do material criopreservado. Tempos de exposição por 30 a 90 minutos resultaram nos maiores valores de recuperação, que, entretanto não diferiram significativamente entre si. Quando comparados ao uso da PVS2 também em temperatura ambiente, os tempos de exposição à PVS3 que resultaram em maiores taxas de recuperação do material criopreservado foram ligeiramente maiores. Isso pode estar relacionado com a composição da PVS3 que, por possuir apenas sacarose e glicerol, geralmente, necessita de maiores tempos de exposição para alcançar níveis de desidratação adequados (SAKAI; ENGELMANN, 2007). Ápices caulinares de *Arabidopsis thaliana* também foram avaliados quanto à sua sensibilidade à PVS3 (TOWILL; BONNART; VOLK, 2006), sendo observado que a exposição à solução crioprotetora por 60 minutos resultou em 100% de recuperação para ápices criopreservados, ao passo que o aumento do tempo de exposição resultou no declínio significativo deste parâmetro.

Considerando os resultados alcançados com cada uma das técnicas de criopreservação investigadas no presente trabalho, embora para a vitrificação o uso de PVS2 a 25°C tenha resultado em maiores percentuais de recuperação, diversos estudos apontam a maior eficiência do processo quando a exposição ao crioprotetor é realizada a baixas temperaturas (CHUA; NORMAH, 2011; IBRAHIM; NORMAH, 2013; TIAU et al., 2009).

Na criopreservação pela técnica de v-crioplaca, conforme observado nos ensaios com PVS2 a 25°C, o aumento do tempo de exposição à PVS3 para 120 minutos resultou em baixos valores de recuperação. Esses resultados contrastam com as taxas de recuperação obtidas com o uso da PVS2 a 0°C, no qual o aumento do tempo de exposição à solução crioprotetora foi benéfico à recuperação de ápices de *C. spinosa* criopreservado. Em contraste, Matsumoto e colaboradores (2014), ao avaliarem a criopreservação de segmentos nodais de *Perilla frutescens* por v-crioplacas, constataram maiores taxas de recuperação para os materiais expostos à PVS2 em temperatura ambiente. O uso do PVS2 a temperatura ambiente também teve efeito positivo na criopreservação de ápices de cana-de-açúcar em detrimento da exposição à PVS3 (RAFIQUE et al., 2015). Por outro lado, o efeito a 0°C das soluções PVS2, PVS2 modificada (KIM et al., 2009) e da PVS3 foi avaliado na

criopreservação de ápices de *Clinopodium odorum,* não sendo observadas . diferenças significativas entre os valores de recuperação obtidos a partir do uso das três soluções (SYLVESTRE-ENGELMANN; ENGELMANN, 2015).

As condições em que os materiais são mantidos após o reaquecimento, etapa denominada de recuperação, desempenham um papel crítico na eficiência da criopreservação. No presente estudo, a recuperação dos ápices foi positivamente afetada pela manutenção do material no escuro, seguida da transferência gradativa para luminosidade. Avaliações preliminares realizadas com a espécie mostraram que a manutenção dos ápices por sete dias na ausência de luz após a criopreservação, resultou na oxidação dos explantes. Tendo em vista esses resultados, optou-se por reduzir o tempo de manutenção do material na condição de ausência de luz para 24 horas, seguido da transferência para luz difusa por uma semana e, por último, para a mesma intensidade luminosa utilizada na manutenção das culturas *in vitro* da espécie.

A manutenção do material vegetal sob luz intensa após a criopreservação pode causar danos devido ao estresse oxidativo, exercendo assim um efeito negativo sobre a sobrevivência e recuperação do material (BENSON, 1990). A influência da luz na etapa de recuperação de ápices caulinares criopreservados de *Alnus glutinosa* foi avaliada por San José e colaboradores (2014) aplicando um protocolo semelhante ao utilizado para *C. spinosa*. A manutenção do material no escuro seguido da transferência para luz difusa por uma semana aumentou significativamente as taxas de sobrevivência e recuperação. Diversos trabalhos indicam que melhores taxas de sobrevivência e recuperação são obtidas quando o material criopreservado é mantido no escuro ou sob baixa intensidade luminosa (GONZÁLEZ-ARNAO et al., 2009; GONZÁLEZ-ARNAO; ENGELMANN, 2006; SEN-RONG; MING-HUA, 2009; TOUCHELL et al., 2002). A manutenção do material na ausência de luz no início da etapa recuperação pode prevenir ou reduzir danos foto-oxidativos (ENGELMANN et al., 2008)

A composição salínica, assim como a natureza e concentração dos reguladores de crescimento presentes no meio de recuperação também desempenham um importante papel na resposta das culturas após a criopreservação. Experimentos prévios com ápices de *C. spinosa* demonstraram que o uso de MS0 para a recuperação não foi adequado para ápices imersos em NL. A inoculação dos ápices criopreservados diretamente em meio MS0 resultou na

oxidação e necrose dos tecidos (dados não mostrados). Por outro lado, a suplementação do meio MS com BAP promoveu um aumento nas taxas de sobrevivência, assim como permitiu a recuperação dos ápices e a ocorrência de multibrotações, mesmo após a criopreservação. A concentração de 0,5 $mg.L^{-1}$ de BAP foi selecionada em função de estudos prévios com a espécie, quando protocolos de micropropagação foram estabelecidos e a suplementação com esta citocinina resultou nas maiores taxas de proliferação de brotos (ALBARELLO et al., 2006).

A atuação das citocininas, principalmente do BAP, na proliferação de brotos *in vitro* é amplamente conhecida. Diversos estudos em criopreservação vêm demonstrando efeito positivo da adição ao meio de recuperação de citocininas isoladas ou em combinação com outros reguladores de crescimento (CANO-CASTILLO; CASAS, 2012; MARKOVIC et al., 2014; RAFIQUE et al., 2015; TURNER et al, 2001). Tal fato parece estar ligado à necessidade de um estímulo requerido pelo material vegetal para dar início à divisão celular após a criopreservação já que, frequentemente, podem ocorrer alterações nos níveis hormonais endógenos devido aos danos ou estresse produzidos durante o processo (WANG et al., 2003). O efeito do BAP na recuperação de ápices criopreservados de cultivares de uva e citrus foi avaliado por Wang e colaboradores (2003). Nesses estudos, da mesma forma como observado em *C. spinosa*, a suplementação com BAP resultou na no aumento das taxas de recuperação.

Entretanto, a suplementação com citocininas vem sendo associada com a ocorrência de calogênese e a indução da hiperidricidade, uma desordem fisiológica, bioquímica e morfológica que ocorre devido ao acúmulo anormal de água no interior das células e tecidos, podendo resultar no estresse oxidativo das culturas (HELOIR et al, 1997; PICOLI et al., 2001; VASCONCELOS et al., 2012).

O desenvolvimento de brotos hiperídricos foi observado a partir de ápices criopreservados de *C. spinosa*, quando submetidos à técnica de vitrificação e recultivados em meio suplementado com BAP. A formação de brotos com aspecto hiperídrico também foi observada em cultivares de uva e citrus com a suplementação de BAP ao meio de recuperação em valores superiores a 4,4 $mg.L^{-1}$ (WANG et al., 2003). Já em segmentos nodais criopreservados da espécie *Crateva nurvala*, a suplementação com a mesma concentração de BAP utilizada para ápices

de *C. spinosa* (0,5 $mg.L^{-1}$) induziu a formação de brotos com a presença de calos (SANAYAIMA et al., 2006).

Os efeitos indesejáveis de uma condição hiperídrica podem ser minimizados mediante a redução da concentração ou tempo de exposição aos reguladores de crescimento (VASCONCELOS et al., 2012). No caso de *C. spinosa*, brotos hiperídricos desenvolvidos a partir de ápices criopreservados pela técnica de vitrificação em PVS2 a 25°C deram origem a plantas com aspecto fenotípico normal após a transferência para meio MS0.

Em contraste ao observado com a aplicação da técnica de vitrificação, ápices criopreservados por v-crioplacas desenvolveram brotos e posteriormente plantas com aspecto fenotípico normal. Tal resposta pode estar relacionada com o grau de estresse e danos gerados aos tecidos pelos diferentes procedimentos de criopreservação. Em um estudo realizado por Matsumoto (2002) com *Wasabi japonica,* no qual diferentes técnicas de criopreservação foram comparadas (vitrificação, encapsulamento-vitrificação e encapsulamento-desidratação), foi constatado por análises histológicas que as técnicas baseadas em vitrificação resultaram em menores danos aos materiais resfriados em NL quando comparadas ao uso do encapsulamento-desidratação.

Os resultados alcançados nos estudos de criopreservação com *C. spinosa* demonstram a viabilidade das técnicas empregadas para a conservação em longo prazo de materiais biotecnológicos produzidos com a espécie. A eficiência na criopreservação, principalmente alcançada com a técnica de v-crioplaca, pode servir de base para novos estudos com outros materiais já estabelecidos pelas técnicas de cultura de tecidos de *C. spinosa*, como raízes *in vitro* e culturas de calos.

CONCLUSÕES

- ✓ Ápices caulinares foram selecionados para os estudos de criopreservação por apresentarem a melhor capacidade de regeneração;

- ✓ As diferentes condições de pré-cultivo testadas só influenciaram as taxas de recuperação quando associadas ao uso de PVS2 a 0°C, não havendo resultados diferenciados no uso de PVS2 e PVS3 a 25°C;

- ✓ A solução de vitrificação PVS2 foi mais eficaz para a recuperação dos ápices caulinares criopreservados, quando comparada à PVS3;

- ✓ A temperatura de tratamento com PVS2 influenciou a criopreservação de forma diferenciada para as duas técnicas empregadas;

- ✓ Pela técnica de vitrificação, o protocolo mais eficaz utilizou ápices caulinares pré-cultivados em 0,3 M de sacarose e expostos à PVS2 (25°C) por 30 minutos;

- ✓ Pela técnica de v-crioplacas, o protocolo mais eficaz utilizou ápices caulinares pré-cultivados em concentrações crescentes de sacarose e expostos à PVS2 (0°C) por 90 minutos;

- ✓ A técnica de v-crioplacas resultou nas maiores taxas de sobrevivência e recuperação após a criopreservação;

- ✓ Os métodos propostos viabilizaram a recuperação de plantas fenotipicamente normais, com capacidade de regeneração ao longo do cultivo.

Perspectivas

Com base nos resultados alcançados, novos experimentos serão conduzidos para avaliar o efeito de soluções de vitrificação alternativas (KIM et al., 2009) e o uso de substâncias antioxidantes no processo de criopreservação (UCHENDU et al., 2010), além do estabelecimento de protocolos pela técnica de D-Crioplacas.

Estudos histológicos serão aplicados no acompanhamento das etapas do processo de criopreservação a partir do melhor protocolo selecionado e as plantas regeneradas serão avaliadas quanto à sua estabilidade genética, por meio de técnicas com marcadores moleculares (RAPD, AFLP).

REFERÊNCIAS

AGRA, M.F et al. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.18, n.3, p.472-508, 2008.

AGRA, M.F.; FREITAS, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.1, p.114-140, 2007.

AHMED, Z. F. et al. Naturally occuring glucosinolates with special reference to those of family Capparidaceae. *Planta Medica*, v.21, n.2, p. 35-60, 1972.

ALBARELLO, N. Aplicação de métodos biotecnológicos para estudos fitoquímicos e farmacológicos de *Cleome spinosa* Jacq. (Capparaceae). 2005. xxf. Tese (Doutorado) -Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.

ALBARELLO, N. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of field-growth plants and tissue culture of *Cleome spinosa* (Jacq.) in mice. *Journal of Medical Plant Resserch*, v.7, n.16, p1043-1049, 2013.

_____. Histological analysis of calluses from *in vitro* propagated plants of *Cleome spinosa* Jacq. *Brazilian Journal of Biosciences***,** v.5, n.2, p.699-701, 2007.

_____. *In vitro* propagation of *Cleome spinosa* (Capparaceae) using explants from nursery-grown seedlings and axenic plants*. In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant,* v.43, p.601-606, 2006.

AMARAL, C.L.F.; SILVA, A.B. Melhoramento biotecnológico de plantas medicinais. *Revista Biotecnologia*, v. 30, p. 55-59, 2003.

BAIRU, M. W., AREMU, A. O.; STADEN, J. V. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. *Plant Growth Regulators,* v.63, p.147-173, 2011.

BELLE R.S.; BELAUBRE, T.V. *Cleome spinosa* extract used in pharmaceutical preparations and cosmetic compositions. US8,007,836B2. Aug.30, 2011.

BENSON, E. E. Cryopreservation Theory. In: REED, B. M. (Ed.) *Plant Cryopreservation - A Practical Guide*. New York, USA: Springer, 2008, p.15-32.

_____. Cryopreserved Germplasm: The biochemical basis of freezing injury *In:* BENSON, E.E. *Free radical damage in stored plant germplasm*. International Board for Plant Genetic Resources, Rome, p. 75-86, 1990.

BEVILACQUA, H.E.C.R. Histórico das plantas medicinais e legislação. In: HARAGUCHI, L.M.M; CARVALHO, O.B. (Ed.). *Plantas Medicinais*. São Paulo: Secretaria Municipal do Verde e do Meio Ambiente. Divisão Técnica Escola Municipal de Jardinagem, 2010, p. 33-38.

BOURGAUD, F. et al. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*, v.161, p.839-851, 2001.

BRASIL. Lei Federal N° 9.985, de 18 de julho de 2000. Institui o sistema nacional de unidades de conservação da natureza e dá outras providências. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Poder Executivo, Brasília, DF, 19 jul. 2000, p.1.

CABRAL, S.C.M.; AGRA, M.F. Etnomedicina e farmacobotânica das Capparaceae da caatinga paraibana, Brasil. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences***,** v.79, p.2-6, 1998.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E.; Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília***.** Brasília: Ed da Embrapa, v.1, 1998, p.87-132.

CANO-CASTILLO, M.; CASAS, J.L. Development of a vitrification-based cryopreservation protocol for the storage of Saltcedar (*Tamarix boveana* Bunge). *CryoLetters,* v. 33, n.3, p. 181-189, 2012.

CARVALHO, J.M.F.C.; VIDAL, M.S. Crioconservação no melhoramento vegetal. Campina Grande: EMBRAPA Algodão, 2003. 24p. (Boletim técnico - Documento, 115).

CASTRO, T.C. et al. Morphological aspects of fruits, seeds, seedlings and *in vivo* and *in vitro* germination of species of the genus *Cleome*. *Journal of Seed Science*, v.36, n.3, p.326-335, 2014.

CHAROENSUB, R. et al. 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, p. 485-492, 2003.

CHAROENSUB, R.; HIRAI, D.; SAKAI, A. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of cassava by Encapsulation-Vitrification method. *CryoLetters,* v.25, n.1, p. 51-58, 2004.

CHUA, S.P.; NORMAH, M.N. Effects of preculture, PVS2 and vitamin C on the survival of recalcitrant *Nephelium ramboutanake* shoot tips after cryopreservation by Vitrification. *CryoLetters,* v.32, n.6, p.506-515, 2011.

COLLINS, D.O. *et al*. New Cembranes from *Cleome spinosa*. *Journal of Natural Products***,** v.67, p.179–183, 2004.

CONCEIÇÃO, G. M. et al. Plantas do cerrado: comercialização, uso e indicação terapêutica fornecida pelos raizeiros e vendedores, Teresina, Piauí. *Scientia Plena*, v. 7, n. 12, 2011.

CONDELLO, E. et al. Genetic stability of wild pear (*Pyrus pyraster*, Burgsd) after cryopreservation by encapsulation dehydration. *Agricultural and food science*, v.18, p.136-143, 2009.

CORDEIRO, L. S.; SIMÕES-GURGEL, C.; ALBARELLO, N. Multiplication and cryopreservation of adventitious roots of *Cleome resea* Vahl. *In Vitro Cellular and Development al Biology*, *no prelo.*

DANSO, K.E.; FORD-LLYOD, B.V. The Effect of Abscisic Acid and Sucrose on Post-Thaw Embryogenic Competence and Subsequent Plant Recovery from Embryogenic Calli of Cassava. *American-Eurasian journal of agricultural & environmental sciences*, v. 3, n. 4, p. 663-671, 2008.

DU, F. W. Discussion on *Cleome spinosa* Jacq. Chinese Floral Bonsai, 1986, n.5, p.6-7. *apud* QUIN, Y., ZENG, F., SUN, X.; FENG, Y.; YANG, C. Propagation of *Cleome spinosa* Jacq through tissue culture. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, v.1, n.5, p.1319-1327.

ELLIS, R.H. The longevity of seeds. *Hortcultural Science*. v.26, p.1119-1125. 1991.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). Manual de curadores de Germoplasma - Vegetal: Conservação *ex situ* (Colbase - Sementes), Brasília - DF, 2010.

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

_____. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. *In Vitro Cell Development and Biology,* v.47, p.5-16, 2010.

ENGELMANN, F.; GONZALEZ-ARNAO, M.T.; WU, Y.; ESCOBAR, R. The development of Encapsulation-Dehydration. In: REED, B.M (Ed). *Plant Cryopreservation: a practical guide*. New York, USA, Springer, p.59-76, 2008.

FABRE, J.; DEREUDDRE, J. Encapsulation-dehydration: a new approach to cryopreservation of Solanum shoot tips. *Cryoletters*, v.11, p.413-426, 1990.

FAHY, G.M. et al. Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology,* v. 21, n. 4, p. 407-426, 1984.

FANG, J.; WETTEN, A.; JOHNSTON, J. Headspace volatile markers for sensitivity of cocoa (*Theobroma cacao* L.) somatic embryos to cryopreservation. *Plant cell Reports,* v. 27, n.3, p. 453-461, 2008.

FRANÇA, S.C. Abordagens biotecnológicas para obtenção de substâncias ativas. In: SIMÕES, C. M. O. *et al*. (Ed.) *Farmacognosia da planta ao medicamento*. Porto Alegre, Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC, p.123-146, 2004

FRANKEL, O. H. Genetic conservation in perspective. In: FRANKEL, O.H.; BENNET, E. *Genetic resources in plants - Their exploration and conservation*. Blackwell, Oxford, Edinburgh, 1970, p.469-489.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. J. Micropropagation: uses and methods. In: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. J. (Ed.) *Plant Propagation by Tissue Culture.* 3rd ed. The Netherlands: Springer, 2008a. p. 29-65,.

_____. Plant Tissue Culture Procedure - Background . In: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. J. (Ed.) *Plant Propagation by Tissue Culture*, 3rd ed. The Netherlands: Springer, 2008b, p. 1-28.

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.

GLOBAL BIODIVERSITY INFORMATION FACILITY (GBIF). Disponível em: <http://www.gbif.org>. Acesso em: jan. 2014.

GOLMIRZAIE A.; PANTA A. Advances in potato cryopreservation at the International Potato Center, Peru. *In*: ENGELMANN, F.; TAKAGI, H. Eds). *Cryopreservation of tropical plant germplasm*: current research progress and applications. Tsukuba, Japão. JIRCAS, p. 250–254, 2000.

GONZALEZ-ARNAO, M.T.; ENGELMANN, F. Cryopreservation of plant germplasm using the encapsulation-dehydration technique: review and case study on sugarcane. *CryoLetters*, v. 27, p. 155–168, 2006.

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

_____. Multiplication and cryopreservation of vanilla (*Vanilla planifolia* 'Andrews'). *In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, v. 45, p.574-582, 2009.

GRIFFITH, M.; YAISH, M.W.F. Antifreeze proteins in overwintering plants: a tale of two activities. *Trends Plant Science*, v.9, n.8, p. 399-405, 2004.

GUERRA, M.P.; NODARI, R.O. *Apostila de Biotecnologia - Cultura de tecidos vegetais*. CCA/UFSC. Steinmacher, p.1-41, 2006.

HALL, J.C.; SYTSMA, KJ.; ILTIS, H.H. Phylogeny of Capparaceae and Brasicaceae based on chloroplast sequence date. *American Journal of Botany*, v.89, n.11, p.1826-1842, 2002.

HALMAGYI, A. et al. Cryopreservation of *Malus* shoot tips and subsequent plant regeneration. *Romanian Biotechnological Letters*, v. 15, n.1, p. 79-85, 2010.

HASSAN, N.A.; HAGGAG, A.M. Cryopreservation of two egyptian grape (*Vitis vinifera*) cultivars using two steps Vvitrification protocol. *World Applied Sciences Journal*, v. 28, n.2, p.254-258, 2013.

HASSLER, M.L. The importance of the units of conservation in Brazil. *Sociedade & Natureza*. v.17,n.13, p.79-89, 2005.

HELLIOT, B. et al. Ultrastructural changes associated with cryopreservation of banana (*Musa* spp.) highly proliferating meristems. *Plant Cell Reports*, v. 21, p. 690-698, 2003.

HELOIR, M. C. et al. An improved procedure for the propagation in vitro of grapevine (t *Vitis vinifera* cv. *Pinot noir*) using axillary-bud microcuttings. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. v.49, n. 3, p. 223-225, 1997.

HEYWOOD, V.H.; DULLOO, M.E. *In situ conservation of wild plant species: a critical global review of best practices*. Roma: IPGRI. IPGRI Technical Bulletin, n.11, 2005.

HIRAI, D. Gelled Droplet Vitrification improves recovery of cryopreserved potato germplasm. *CryoLetters*, v. 32, n.4, p.287-296, 2011.

HONG, T.D.; LININGTON, S.; ELLIS, R.H. *Seed storage behaivor: a compendium* (Handbooks for Genebanks: No. 4). International Plant Genetic Resources Institute , Rome, 1996.

IBRAHIM, S.; NORMAH, M.N. The survival of in vitro shoot tips of *Garcinia mangostana* L. after cryopreservation by Vitrification. *Plant Growth Regulators*, v. 70, p.237-246, 2013.

ILIEV, I. et al. Plant micropropagation. In: DAVEY, M.R.; ANTHONY, P. *Plant cell culture: essential methods.*1ª ed. Inglaterra: Wiiley-blackwell, 2010.

INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE (IUCN). *Guidelines on the Management of Ex Situ Populations for Conservation*. Approved at the 14th Meeting of the Programme Committee of Council, Gland Switzerland, 2002.

JUDD, W. S.; SANDERS, R.W.; DONOGHUE, M.J. Angiosperm family pairs: preliminary phylogenetic analyses. *Harvard Papers in Botany***,** v. 5, p. 1–51, 1994.

JUNG, D-W. et al. Cryopreservation of *Hyoscyamus niger* adventitious roots by vitrification. *Journal of Plant Physiology*, v. 158, p. 801-805, 2001.

JUNGHANS, T.G; SOUZA, A. da S. Aspetos Práticos da Micropropagação de Plantas. Cruz das Almas, Bahia. *Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical*, , 1ª Ed, 2009, p.324-331.

KALITA, V. et al. Vitrification-based cryopreservation of shoot-tips of *Pinus kesiya* royle ex. gord*. CryoLetters*, v.33, n.1, p. 58-68, 2012.

KIM, H. et al. Development of a alternative plant vitrification solutions in Droplet-Vitrification procedures. *CryoLetters*, v. 30, n. 5, p 320-334, 2009.

KIM, H.; LEE, S. Personalisation' of droplet-vitrification protocols for plant cells: a systematic approach to optimising chemical and osmotic effects**.** *CyoLetters*, v. 33, n.4, p. 271-279, 2012.

KOLEWE, M.E.; GAURAV, V.; ROBERTS, S.C. Pharmaceutically active natural product synthesis and supply via plant cell culture technology. *Molecular Pharmaceutics*, v. 5, n. 2, p. 243-256, 2008.

KOSTER, K.L. Glass formation and desiccation tolerance in seeds. *Plant Physiology*, n. 96 p.302-304, 1991.

LAMBERT, E. et al. Cryopreservation of hairy root cultures of *Maesa lanceolata* and *Medicago truncatula*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 96, n. 3, p. 289-296, 2009.

LARKIN, P.J.; 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.

LEAL, R de S. et al. Perfil Etnobotânico e Atividade Antioxidante de *Cleome spinosa* (Brassicacea) e *Pavonia varians* (Malvaceae). *Revista Fitos*, v. 3, n. 3, 2007.

LEE, Y.G. et al. Improved cryopreservation of Chrysanthemum (*Chrysanthemum mori-folium*) using Droplet-Vitrification. *CryoLetters*, v. 32, n.6, p. 487–497, 2011.

LEMOS, E.E.P. de. Organogênese. In: CID, L.P.B. (Ed.). *Cultivo in vitro de plantas*. Brasília (DF), Brasil: Embrapa, p. 104-122, 2010.

LEUNUFNA, S.; KELLER, E. R. J. Investigating a new cryopreservation protocol for yams (*Dioscorea* spp.). *Plant Cell Reports*, v.30, n.5, p.320-334, 2009.

LIU, Y.; WANG, X.; LIU, L. Analysis of genetic variation in surviving apple shoots following cryopreservation by vitrification. *Plant Science*, v.166, p.677-685, 2004.

MARASCHIN, M; VERPOORTE, R.; Engenharia do metabolismo secundário: Otimização da produção de metabólitos secundários em cultura de células vegetais. *Bio-tecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, n.10, 1999.

MARKOVIĆ, Z. et al. Duration of culture of grapevine (*Vitis vinifera*) microcuttings on medium with zeatin riboside affects shoot tip recovery after cryopreservation. 2012

_____. Efect of shooting medium and source of material on Grapevine (V*itis vinifera* l.) shoot tip recovery after cryopreservation. *CryoLetters*, v. 35, n.1, p. 40-47, 2014.

MATSUMOTO, T. Cryopreservation of in vitro grown apical shoot tips of *Wasabia japonica* (Wasabi) by different procedures. In: TOWIL, L.E.; BAJAJ, Y.P.S. (Ed.). *Biotechnology in Agriculture and Forestry:* Cryopreservation of Plant Germplasm II. Berlim, 2002, p.180-195.

MATSUMOTO, T. et al. Development of *in vitro* propagation by node culture and cryopreservation by V-Cryo-plate method for *Perilla frutescens. Advances in Horticultural Science*, v. 28, n. 2, p. 79-83, 2014.

MCNEIL, M.J. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from *Cleome spinosa*. *Natural Product Communications* v.5, n.8, p.1301-1306, 2010.

MEDEIROS, A.C. de S.; EIRA, M.T.S. de. Comportamento fisiológico, secagem e armazenamento de sementes florestais nativas. *Circular técnica*, 127. Colombo: Embrapa Florestas, 2006.

MENON, A. et al. Cyopreservation of *Lomandra sonderi* (Asparagaceae) shoot tips using Droplet-Vitrification. *CryoLetters*, v. 33, n.4, p.259-270, 2012.

MERHY, T.S.M. et al. Cryopreservation of *Passiflora pohlii* nodal segments and assessment of genetic stability of regenerated plants. *CryoLetters*, v.35, n.3, p.204-215, 2014.

MIAO, L.S. et al. Rapid Propagation of *Cleome spinosa*. *Songliao Journal (Natural Science Edition).* no. 1, p. 65-67, 1990.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (MMA). *Convenção sobre diversidade biológica.* (CDB), Brasília - DF, 2000. Acesso: Agosto de 2014. Disponível em: www.mma.gov.br/estruturas/sbf_dpg/_arquivos/cdbport.pdf.

MULDREW, K.; MCGANN, L.E.*Cryobiology: a short course*, 1999. Acessado em Setembro de 2014. Disponível em: people.ucalgary.ca/~kmuldrew/cryo_course/course_outline.html

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plantarum***,** v.15, p.473–497, 1962.

MURTHY, S. S. N. Some Insight into the Physical Basis of the Cryoprotective of Dimethyl Sulfoxide and Ethylene Glycol. *Cryobiology,* v. 36, p. 84-96, 1998.

NIINO, T. et al. Dehydration improves cryopreservation of mat rush (*Juncus decipiens* nakai) basal stem buds on cryo-plates. *Cryoletters*, v.34 (6), p.549-560, 2013.

NISHIZAWA, S. et al. Cryopreservation of Asparagus (*Asparagus officinalis* L.) embryogenic suspension cells and subsequent plant regeneration by Vitrification method. *Plant science*, v.88, p.67-73, 1993.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS), 2008.*Tradicional Medicine*. Disponível: http://www.who.int/topics/traditional_medicine/en/

PANIS, B. et al. Sucrose preculture to simplify cryopreservation of banana meristem cultures. *CryoLetters*, v.23, n.6, p. 375-384, 2002.

PANIS, B.; LAMBARDI, M. Status od cryopreservation technologies in plants (crop and forest trees). In: RUANE, J.; SONNINO, A. (Eds.) *The role of biotechnology in exploring and protecting agricultural genetic resources*. Rome, FAO, 2006, p.61-78.

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.

PENCE, V.C. et al. *In vitro collecting techniques for germplasm conservation*. Roma; IPGRI . IPGRI Technical Bulletin, n.7, 2002.

PENNYCOOKE, J.C.; TOWILL, L.E. Cryopreservation of shoot tips from in vitro plants of sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] by Vitrification. *Plant Cell Reports*, v.19, n.7, p. 733-737, 2000.

_____. Medium alterations improve regrowth of sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam.) shoot tips cryopreserved by vitrification and Encapsulation-Dehydration. *CryoLetters*, v.22, n.6, p. 381–389, 2001.

PEREIRA, D.A.; BRITO, A. C.; AMARAL, C. L. F. Biologia floral e mecanismos reprodutivos do mussambê (*Cleome spinosa* Jacq.) com vistas ao melhoramento genético. *Biotemas*, v.20, n.4, p 27-34. 2007.

PERES, L.E.P. Bases fisiológicas e genéticas da regeneração de plantas *in vitro*. *Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento*. v.25, p.44-48, março/abril, 2002.

PICOLI, E.A.T. et al. Hyperhydricity in *in vitro* eggplant regenerated plants: structural characteristics and involvement of BiP (Binding Protein). *Plant Science*, v.160, p.857-868, 2001.

QUIN, Y. et al. Propagation of *Cleome spinosa* Jacq through tissue culture. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences***,** v.1, n.5, p.1319-1327, 2012.

RAFIQUE, T. et al. Cryopreservation of sugarcane using the V Cryo-plate technique. *CryoLetters*, v.36, n.1, p.51-59, 2015.

RAMACHANDRA-RAO, S.; RAVISHANKAR, G.A. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, v. 20, p. 101-153, 2002.

RAMON, M. et al. Polyamines and fatty acids in sucrose precultured banana meristems and correlation with survival rate after cryopreservation. *CryoLetters*, v.23, n.6, p. 345-352, 2002.

RAO, N.K. Plant genetic resources: Advancing conservation and use through biotechnology. *African Journal of Biotechnology,* v. 3, n. 2, p. 136-145, 2004.

RAY, A.; BHATTACHARYA, S. Cryopreservation of *in vitro* grown nodal segments of *Rauvolfia serpentina* by PVS2 vitrification. *CryoLetters*, v. 29, n.4, p.321-328, 2008.

ROCA, W.M. et al. Cryopreservation and cassava germplasm conservation at CIAT. *In:* ENGELMANN, F.; TAKAGI, H. (eds) *Cryopreservation of tropical plant germplasm:* current research progress and application. JIRCAS, sukuba/IPGRI, Rome, pp 273–279, 2000.

RODMAN, J. E. et al. Parallel evolution of glucosinolate biosynthesis inferred from congruent nuclear and plastid gene phylogenies. *American Journal of Botany*. v.85, p. 997–1006, 1998.

RUŽIĆ, D.; VUJOVIĆ, T.; CEROVIĆ, R. Cryopreservation of cherry rootstock Gisela 5 using Vitrification procedure. *Horticultural Science*, v. 41, n.2, p. 55-63, 2014.

SAN JOSÉ, M.C. Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. *Acta Physiologiae Plantarum*, v.36, p.109-116, 2013.

SANAYAIMA, R. K. et al. 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.

SANT, R.; TAYLOR, M.; TYAGI, A. Cryopreservation of in vitro-grown shoot-tips of tropical taro (*Colocasia esculenta* var. *esculenta*) by Vitrification. *CryoLetters*, v.27, n.3, p.133-142, 2006.

SANTOS, D. A.; MENEZES, J.E.S.A. Estudo das atividades citotóxica e antimicrobiana de *Cleome spinosa* espécie nativa do município de Itapipoca. Anais da 57ª Reunião Anual da SBPC - Fortaleza, CE - Julho, 2005.

SANTOS, I.R.I. Criopreservação de germoplasma vegetal. *Bio-Tecnologia: Ciência & Desenvolvimento*, v.20, p. 60-65, 2001.

_____. Criopreservação: Potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal,* v.12, p.70-84, 2000.

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E. P., GOSMANN, G., MELLO, J. C. P., MENTZ, L. A., PETROVICK, P. R. (Ed.) *Farmacognosia da planta ao medicamento*. Porto Alegre, Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC, p.403-434, 2004.

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.

_____. Plant cryopreservation. In: FULLER, B. J.; LANE, N.; BENSON, E. E. (Ed.) *Life in the Frozen State*. United States of America: CRC Press LLC, 2004, p.329-334.

SAKAI, A.; ENGELMANN, F. Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: a review. *CryoLetter*s, 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, 2008, p. 33-57.

SAKAI, A.; KOBAYASHI, S.; OIYAMA, I. Cryopreservation of nucellar cells of naval orange (*Citrus sinesis* Osb. var. brasiliensis Tanaka) by vitrification. *Plant Cell Reports*, v.9, p.30-33, 1990.

SEKIZAWA, K. et al. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) by vitrification method using aluminium cryo-plates. *Plant Biotechnology***,** v.28, p.401-405, 2011.

SEN-RONG, H.; MING-HUA, Y. High-efficiency vitrification protocols for cryopreservation of *in vitro* grown shoot tips of rare and endangered plant *Emmenopterys henryi* Oliv. *Plant Cell, Tissue Organ Culture*, v. 99, p.217-226, 2009.

SHATNAWI, M.A. Cryopreservation of *Capparis spinosa* shoot tips via Vitrification, Encapsulation-Dehydration and Encapsulation-Vitrification. *World Applied Sciences Journal,* v.15, n.3, p.318-325, 2011.

SUBAIH, W. S.; SHATNAWI, M.A.; SHIBLI, R.A. Cryopreservation of Date Palm (*Phoenix dactylifera*) Embryogenic Callus by Encapsulation-Dehydration, Vitrification and Encapsulation-Vitrification. *Jordan Journal of Agricultural Sciences*, v. 3, n.2, 2007.

SUZUKI, M. et al. Development of a new vitrification solution, VSL, and its application to the cryopreservation of gentian axillary buds. *Plant Biotechnology Reports*, v. 2, p. 123-131, 2008.

_____. Physiological changes in gemtian axillary buds during two-step preculturing with sucrose that conferred high levels of tolerance to desiccation and cryopreservarion. *Annal of Botany*, v.97, p.1073-1081, 2006.

SYLVESTRE-ENGELMANN, I.; ENGELMANN, F. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of *Clinopodium odorum* using aluminium cryo-plates. *In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant,* v. 51, n.1, 2015.

TERMIGNONI, R.R. *Cultura de Tecidos Vegetais: Morfogênese e crescimento in vitro*. 1ªed. Editora da UFRGS, Porto Alegre, 2005.

TIAU, K.H. et al. An assessment of early factors influencing the PVS2 vitrification method using protocorm-like bodies od Dendrobium Sonia 28. *American-Eurasian Journal Sustainable Agriculture*, v. 3, n.3, p.280-289, 2009.

TOUCHELL, D.H. et al. Cryopreservation of Australian species - the role of plant growth regulators. In: Towill IE, Bajaj YPS (eds) *Biotechnology in agriculture and forestry, cryopreservation of plant germplasm II*, vol 50. Springer, Berlin, pp 373-390, 2002.

TOWILL, L.E; BONNART, R.; VOLK, G.M. Cryopreservation of *Arabidopsis thaliana* shoot tips. *CryoLetters*, v. 27, n.6, p. 356-360, 2006.

Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. Disponível em: <http://www.tropicos.org>. Acesso em: dez 2013.

TURNER, S.R. et al. Cryopreservation of shoot tips from six endangered Australian species using a modified vitrification protocol. *Annals of Botany*, v. 87, p.371-378, 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.

URAGAMI, A. et al. Survival of cells and somatic embryos of *Asparagus officinalis* cryopreserved by Vitriication. *Plant Cell Reports*, v.8, p.418-421, 1989.

VALLADARES, S. et al. Cryopreservation of embryogenic cultures from mature *Quercus suber* trees using vitrification. *CryoLetters*, v. 25, n.3, p177-186, 2004.

VANDENBUSSCHE, B et al. Changes in sugar content and fatty acid composition of in vitro sugar beet shoots after cold acclimation: influence on survival after cryopreservation. *Plant Growth Regulation*, v. 28, n. 3, p. 157-163, 1999.

VANISREE, M. et al. 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.

VASCONCELOS, A. G. V. De. et al. Hiperidricidade: uma desordem metabólica. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.42, n.5, p. 837-844, 2012.

VERLEYSEN, H.; BOCKSTAELE, E. V.; DEBERGH, P. An encapsulation-dehydration protocol for cryopreservation of azalea cultivar "Nordlicht" (*Rhododendron simsii* Planch.).*Scientia Horticulturae***,** v.106, p.402-414, 2005.

VIDAL, N. et al. Cryopreservation of chestnut by vitrification of in vitro-grown shoot tips**.** *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, v.41, p. 63-68, 2005.

VIEIRA, C. V. et al. Germinação e armazenamento de sementes de camboatã (*Cupania vernalis* cambess.) Sapindaceae. *Ciência e agrotecnologia*, v. 32, p. 444-449, 2008.

VIEIRA, M. L. C. Conservação de germoplasma: tecnologias *in vitro* aplicadas à conservação de recursos genéticos vegetais. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, v.14, 2000.

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

VOLK, G. M.; WALTERS, C. Plant vitrification solution lowers water content and alters freezing behavior in shoot tips during cryoprotection. *Cryobiology*, v. 52, p. 48-61, 2006.

VOZNESENSKAYA, E.; KOTEYEVA, N. K.; CHUONG, S. D. X. Physiological, anatomical and biochemical characterization of the type of photosynthesis in *Cleome* species (Cleomaceae). *Functional Plant Biology,* v. 34 p.247–267, 2007.

YAMAMOTO, S. et al. Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of strawberry by the Vitrification method using aluminium cryo-plates. *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization*, v.10, n.1, p.14-19, 2012a.

_____. Development of a cryopreservation procedure using aluminium cryo-plates. *Cryoletters*. v.32, n.3, p.256-265, 2011.

_____. The Aluminum Cryo-plate Increases Efficiency of Cryopreservation Protocols for Potato Shoot Tips, *American Journal of Potato Research*, 2015.

_____. V-cryo-plate procedure as an effective protocol for cryobanks: case study of mint cryopreservation. *Cryoletters*, v.33, n.1, p.12-23, 2012b.

YOSHIBA, Y. et al. Regulation of levels of proline as an osmolyte in plants under water stress. *Plant Cell Physiology*, v. 30, n.10, p. 1095-1102, 1997.

WANG, J. M. et al. Studies on plant regeneration of *Cleome spinosa* Jacq. *in vitro*. *Acta Horticulturae Sinica*, vol. 31, n. 1, p. 115-116, 2004.

WANG, Q. et al. A simple and efficient cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of Troyer'citrange [*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.× *Citrus sinensis* (L.) Osbeck.] by encapsulation-vitrification. *Euphytica*, v.128, n.1, p. 135-142, 2002.

_____. Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of raspberry (*Rubus idaeus* L.) by encapsulation–vitrification and encapsulation–dehydration. *Plant Cell Reports***,** v.24, p. 280-288, 2005.

_____. Effect of benzyladenine on recovery of cryopreserved shoot tips of grapevine and citrus cultured *in vitro. CryoLetters*, v.24, p. 293-302, 2003.

XUE, S. H. et al. Cold storage and cryopreservation of hairy root cultures of medicinal plant *Eruca sativa* Mill., *Astragalus membranaceus* and *Gentiana macrophylla.* Pall. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v.92, p. 251-260, 2008.

ZHU, G. et al. Change in sugar, sterol and fatty acid composition in banana meristems caused by sucrose-induced acclimation and its effects on cryopreservation. *Physiologia Plantarum*, v. 128, p. 80-94, 2006.