

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**GUILHERME DE ASSIS CLEMES DOS SANTOS**

**ESTRATÉGIAS PARA A CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE GERMOPLASMA  
VEGETAL: POTENCIAIS E PERSPECTIVAS**

**FLORIANÓPOLIS  
2023**

Guilherme de Assis Cledes dos Santos

**ESTRATÉGIAS PARA A CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE GERMOPLASMA  
VEGETAL: POTENCIAIS E PERSPECTIVAS.**

Projeto de pesquisa submetido ao curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para obtenção do título de Licenciado em Ciências Biológicas, sob orientação da professora Doutora Ana Maria Viana.

Florianópolis  
2023

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer a Dra. Ana Maria Viana pela orientação, por aceitar ser a minha orientadora e tornar possível a realização desse trabalho.

Aos meus professores da UFSC que abriram minha mente e me mostraram a beleza das diferentes áreas da biologia.

Aos meus amigos, vocês deixaram a graduação mais leve, divertida fazendo com que eu continuasse.

Aos meus familiares que sempre estiveram presentes e de alguma forma me incentivaram a finalizar o curso.

Aos meus pais Ju e Assis por sempre acreditarem em mim e possibilitarem concluir minha graduação, aconselhando e ajudando em todas as minhas decisões.

## RESUMO

A presente revisão aborda a importância da conservação *in vitro* de germoplasma para reduzir os danos à biodiversidade brasileira, que está ameaçada devido à degradação de biomas como a Amazônia, o Pantanal, o Cerrado, o Pampa, a Mata Atlântica e a Caatinga. O desmatamento e a ocupação humana são alguns dos principais fatores que ameaçam esses biomas e a biodiversidade que eles abrigam. A variabilidade genética das espécies é ameaçada pela degradação e exploração ambiental, colocando-as em risco de extinção. Bancos de germoplasma vegetal *in vitro* são essenciais para conservar a base genética, especialmente de cultivos de árvores frutíferas, medicinais e economicamente valiosas. A criopreservação é uma técnica usada para conservar esses materiais por longos períodos, em bancos de germoplasma, sem perder as características anatômicas, fisiológicas e genéticas. O objetivo deste trabalho foi avaliar os artigos científicos produzidos no mundo e no Brasil, no período de 2018 a 2022, através dos levantamentos conduzidos em dois periódicos internacionais (Journal of Plant Cell Tissue and Organ Culture e Cryoletters) e nacionais (periódicos cadastrados na Scientific Electronic Library Online - SciELO). Os artigos foram revisados quanto às espécies estudadas, os materiais vegetais e os diferentes tipos de protocolos de criopreservação utilizados, incluindo ou não o uso de crioprotetores, para evitar a formação de cristais de gelo no interior das células. As espécies de importância alimentar, medicinal, ornamental e ameaçadas de extinção foram as mais estudadas, as pontas de ramos e gemas foram os materiais vegetais mais utilizados e predominou o método da vitrificação e suas variações. A análise mostrou que o número de artigos científicos produzidos no Brasil e publicados em ambos os periódicos internacionais foi equiparado aos dos países Índia e EUA, todos eles abaixo da China, que liderou o ranking de número de artigos publicados no mundo. Um número maior de artigos produzidos em instituições brasileiras e com espécies nativas foram publicados em periódicos nacionais, em contraste com os periódicos internacionais. O número relevante de dissertações e teses desenvolvidas nas universidades brasileiras localizadas no sul, sudeste, centro-oeste e nordeste sugere perspectivas positivas para o Brasil nos próximos anos, tanto na formação de recursos humanos para atuar na área de conservação como no sentido de desenvolver protocolos de conservação *in vitro* para as espécies brasileiras ameaçadas de extinção e estabelecimento de bancos de germoplasma.

**Palavras-chave:** criopreservação, conservação *in vitro*, bancos de germoplasma *in vitro*.

## ABSTRACT

This review addresses the importance of *in vitro* germplasm conservation to reduce damage to Brazilian biodiversity, which is threatened due to the degradation of biomes such as the Amazon, the Pantanal, the Cerrado, the Pampas, the Atlantic Forest, and the Caatinga. Deforestation and human occupation are among the main factors endangering these biomes and the biodiversity they harbor. The genetic variability of species is threatened by environmental degradation and exploitation, putting them at risk of extinction. *In vitro* plant germplasm banks are essential for conserving the genetic base, especially for economically valuable fruit and medicinal tree crops. Cryopreservation is a technique used to preserve these materials for long periods in germplasm banks without losing their anatomical, physiological, and genetic characteristics. The objective of this study was to evaluate scientific articles produced worldwide and in Brazil from 2018 to 2022 through surveys conducted in two international journals (Journal of Plant Cell Tissue and Organ Culture and Cryoletters) and national journals (journals registered in the Scientific Electronic Library Online - SciELO). The articles were evaluated regarding the studied species, plant materials, and different types of cryopreservation protocols used, including or not the use of cryoprotectants to prevent the formation of ice crystals inside the cells. Food, medicinal, ornamental and species threatened of extinction predominated in the studies, the shoot tips and buds were the preferred plant materials and vitrification and its variations the most frequent method of cryopreservation. The analysis showed that the number of scientific articles produced in Brazil and published in both international journals was comparable to that of India and the USA, all of them below China, which led the ranking of the number of articles published worldwide. A significantly greater quantity of articles produced in Brazilian institutions and focusing on native species were published in national journals, in contrast to international journals. The significant number of dissertations and theses developed in Brazilian universities located in the South, Southeast, Midwest, and Northeast suggests positive prospects for Brazil in the coming years, both in terms of human resources training to work in the conservation field and in developing *in vitro* conservation protocols for endangered Brazilian species and establishing germplasm banks.

**Key words:** cryopreservation, *in vitro* conservation, *in vitro* germplasm banks.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Detalhes das placas utilizadas nos diferentes tipos de vitrificação nos artigos de criopreservação.....	20
Figura 2 - Etapas da criopreservação utilizadas na vitrificação em gotículas sobre tiras de alumínio.....	21

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Artigos sobre criopreservação de plantas publicados no periódico Plant Cell Tissue and Organ Culture (Springer).....	23
Tabela 2 - Artigos sobre criopreservação de plantas publicados no periódico Cryoletters.....	25
Tabela 3 - Número de artigos científicos sobre criopreservação de plantas publicados por ano.....	49
Tabela 4 - Número total de artigos científicos publicados por país.....	50
Tabela 5 - Número de espécies estudadas, de acordo com a utilidade.....	51
Tabela 6 - Número de artigos dos diferentes tipos de materiais vegetais criopreservados.....	52
Tabela 7 - Número de artigos científicos por tipo de método utilizado na criopreservação de plantas.....	53
Tabela 8- Alguns artigos científicos produzidos no Brasil publicados em periódicos da plataforma SCIELO no período 2018-2022.....	55
Tabela 9 - Teses e dissertações realizadas no período 2018-2022 em instituições brasileiras.....	57

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. OBJETIVOS.....	12
2.1. Objetivos gerais.....	12
2.2. Objetivos específicos.....	12
3. METODOLOGIA .....	12
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
4.1. Criopreservação e conservação <i>in vitro</i> de germoplasma.....	13
4.2. Princípios dos métodos de criopreservação.....	15
4.2.1 Desidratação.....	15
4.2.2 Congelamento lento em freezer programável.....	16
4.2.3 Vitrificação.....	17
4.2.4 Vitrificação em gotículas.....	18
4.2.5 Vitrificação em crioplaca (V-crioplaca, D-crioplaca, Placa de malha de aço inoxidável).....	18
4.2.6 Encapsulamento, encapsulamento-desidratação e encapsulamento- vitrificação.....	21
4.3 Materiais vegetais e métodos de criopreservação utilizados nos artigos científicos publicados na PCTOC e Cryoletters no período 2018-2022.....	22
4.3.1 Pólen.....	29
4.3.2 Sementes.....	30
4.3.3 Embriões somáticos e zigóticos.....	30

4.3.4	Protocórmios.....	31
4.3.5	Plântulas.....	32
4.3.6	Raízes.....	32
4.3.7	Meristema Apical.....	34
4.3.8	Gemas de rizomas, gemas adventícias de folhas, gemas axilares de segmentos de caule.....	35
4.3.9.	Pontas de ramos.....	39
4.3.9.1	Encapsulamento-desidratação.....	40
4.3.9.2	Vitrificação.....	41
4.3.9.3	Tiras de papel alumínio.....	42
4.3.9.4	Encapsulamento–vitrificação.....	44
4.3.9.5	V-crioplaca (Desidratação em crioplacas em solução de vitrificação).....	44
4.3.9.6	D-crioplaca (Desidratação em crioplacas no fluxo laminar).....	45
4.3.10	Culturas embriogênicas.....	46
4.3.11	Suspensões celulares.....	48
4.3.12	Calos.....	49
4.4	Análise métrica dos artigos científicos publicados na PCTOC e Cryoletters no período 2018-2022.....	50
4.5	Artigos científicos publicados em periódicos cadastrados na Scielo no período 2018-2022.....	54
5.	CONCLUSÃO.....	59
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62

## 1 INTRODUÇÃO

Os níveis populacionais de espécies de animais e vegetais estão caindo drasticamente, existindo certos fatores que influenciam e ameaçam a biodiversidade brasileira, entre os quais os relacionados com a exploração humana (COSTA; MELLO, 2020). Também é importante citar os fenômenos naturais relacionados aos desastres naturais que são outros fatores que podem causar danos estruturais, socioeconômicos e até biológicos, estes podem se somar aos fatores antrópicos levando à perda da variabilidade genética, colocando certas espécies de animais e plantas em risco de extinção (FILGUEIRA, 2012). Neste sentido é relevante ressaltar a importância dos bancos de germoplasma vegetal que podem garantir a conservação da base genética de espécies vegetais.

O bioma Amazônia abriga a maior floresta do mundo com 4.196.943 km<sup>2</sup> segundo (IBGE 2004) ocupando 49,3% do território brasileiro. O bioma Pantanal é a maior planície alagada do mundo com um território de 138.183 Km<sup>2</sup> de território equivale a 1,8%, do território brasileiro, pesquisas apontam 18% de desmatamento (CAMPELLO et al., 2021).

O Cerrado possui espécies únicas de árvores, plantas e animais, cobre 23,9% do território brasileiro, possui uma área de 2.036.448 Km<sup>2</sup>. Estima-se que já foi perdido 50% da sua área total. (WWF 2022). O bioma Pampa é uma área muito explorada pela agricultura e ocorre apenas no Rio Grande do Sul, ocupando 2,1 % do território brasileiro possuindo uma área de 178.243 km<sup>2</sup>. Em torno de 55 % da vegetação já sofreu descaracterização, inclusive em áreas de unidades de conservação (ECHER et al., 2015).

A Caatinga possui um território de 844.453 km<sup>2</sup>, o qual equivale a 9,9 % do território brasileiro (IBGE, 2014). Estudos apontam que 40% desse bioma já foram desmatados. (CEPAN 2020). A Mata Atlântica ocupa 13% do território do país, possui

um território de 1.110.182 km<sup>2</sup> restando apenas 12,4 % da floresta original e é o bioma mais ameaçado. (FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA, 2021).

A perda da variabilidade genética, devido à degradação e exploração ambiental colocou várias espécies de vegetais e animais em risco de extinção. Por isso, foram desenvolvidos os conceitos de preservação de populações fora do local de origem (conservação *ex situ*). Essas espécies, mesmo assim, ainda ficam expostas aos fatores do ambiente natural que ameaçam a sua sobrevivência em longo prazo, podendo ser perdidas, o que não ocorre no caso dos bancos de germoplasma mantidos *in vitro*. (NASCIMENTO; MEIADO 2016).

Nos bancos de germoplasma vegetal mantidos *in vitro* é possível utilizar sementes, embriões, grãos de pólen, óvulos, calos e meristemas capazes de regenerar plantas inteiras, podendo estes materiais vegetais serem preservados por longo prazo sem perder as características anatômicas, fisiológicas e genéticas através da criopreservação, que é um método de conservação *ex situ* em que os materiais vegetais citados acima são mantidos em temperaturas de -196°C em nitrogênio líquido (REED et al., 2013). A possibilidade de utilização de materiais vegetais desenvolvidos através de culturas *in vitro* é de extrema relevância por representar uma alternativa para a criopreservação principalmente daquelas espécies que apresentam dificuldades na produção, na germinação e na manutenção da viabilidade de sementes por longos períodos de armazenamento.

Tendo em vista importância do desenvolvimento de estratégias para preservar espécies vegetais a criopreservação, sendo um método eficaz para a conservação do germoplasma, viabiliza o estabelecimento de bancos de germoplasma *in vitro* das espécies em extinção. Além disso, pode ser utilizada, ao lado das estratégias de restrição do crescimento, sendo uma estratégia relevante de conservação, principalmente em países como o Brasil, que tem uma grande biodiversidade de espécies.

## 2 OBJETIVOS

## 2.1 Objetivo Geral

O objetivo deste estudo foi realizar uma revisão bibliográfica dos artigos científicos publicados a partir do ano de 2018 até o ano de 2022 acerca do tema, a fim de investigar os avanços, as limitações e as perspectivas na área da criopreservação e de outras estratégias de conservação *in vitro* de germoplasma vegetal, no Brasil e no mundo.

## 2.2 Objetivos Específicos

- Como objetivos específicos deste trabalho sobre a criopreservação de germoplasma vegetal pretendeu-se, a partir da leitura dos artigos obtidos no levantamento, compilar informações sobre os seguintes parâmetros:
- Espécies estudadas
- Países em que foram realizados os trabalhos
- Critérios para as escolhas das espécies estudadas: utilidade, valor econômico, ameaça de extinção.
- Materiais vegetais e métodos de criopreservação utilizados
- Bancos de germoplasma no Brasil e em outros países.
- Problemas encontrados na criopreservação de determinadas espécies
- A partir das informações obtidas na revisão bibliográfica avaliar as perspectivas futuras com relação à conservação *in vitro* de espécies nativas dos biomas brasileiros

## 3 METODOLOGIA

A pesquisa foi realizada no período de 2018 – 2022 em dois periódicos internacionais importantes na área de criopreservação de plantas:

- Science Direct.
- Periódicos específicos da área:
- Plant Cell Tissue and Organ Culture (PCTOC)
- Cryoletters
- SCIELO Brasil (Scientific Eletronic Library Online)

As palavras-chave para busca foram “plant cryopreservation”, “plant *in vitro* conservation”, “plant *in vitro* germplasm banks”.

Foram selecionados os artigos acadêmicos que apresentavam as informações sobre os parâmetros mencionados nos objetivos específicos do trabalho.

Os recursos utilizados foram Computador, acesso à internet, acesso à Rede Virtual Privada (VPN) da Universidade Federal de Santa Catarina.

## **4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **4.1. CRIOPRESERVAÇÃO E CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE GERMOPLASMA**

A criopreservação é considerada o método ideal de conservação *ex-situ* de germoplasma vegetal por longos períodos e complementa as estratégias de conservação das coleções de germoplasma mantidas no campo e *in vitro* (BETTONI, BONNART E VOLK, 2020). Visa assegurar a estabilidade do material genético e a sua herança, evitar a extinção de espécies de plantas, preservando a vida útil do material vegetal. Após o período de armazenamento o material vegetal criopreservado pode ser descongelado e recuperado para viabilizar a produção de plantas ou de linhagens celulares para a produção de compostos de interesse. É importante evitar a formação do gelo intracelular nesse processo de congelamento e descongelamento e por isso são utilizados crioprotetores evitando a morte celular (BENSON, 1994).

Na conservação *in vitro* de plantas é necessário considerar, além da criopreservação, os métodos de restrição do crescimento *in vitro*. Para isso são manipulados componentes principais dos meios de cultura, que vão impedir ou desacelerar o crescimento das plantas *in vitro*. Alguns reguladores de crescimento vegetal, podem ser adicionados ao meio de cultura para inibir ou retardar o crescimento, como os bloqueadores da biossíntese das giberelinas, hormônios naturais das plantas que promovem o crescimento (REED *et al.*, 2013). Além da utilização de inibidores do crescimento no meio de cultura, pode ser utilizado o método de conservação das plantas

micropropagadas em baixas temperaturas de 1 a 9 graus, não congelantes, sendo uma opção prática, segura que não necessita de muitos investimentos.

As sementes ortodoxas têm a capacidade de tolerar a secagem e a baixa umidade sem prejudicar o seu metabolismo, além de preservar sua integridade durante o armazenamento de longa duração e podem sofrer dessecação maior quando comparadas com as sementes recalcitrantes ou intermediárias, resistindo à criopreservação (ZOMER, 2021). Os cristais de gelo, que podem se formar na criopreservação, durante o congelamento, interferem na fisiologia e na viabilidade das sementes que apresentam teores de água acima de 10%, sendo necessário utilizar aos tratamentos crioprotetores, para preparar os tecidos das sementes contra a formação de cristais de gelo. As sementes da Mata Atlântica, na sua maioria recalcitrantes não são resistentes ao congelamento, com alta perda de umidade, sendo necessários tratamentos crioprotetores antes do congelamento, que dificultam que a água se congele formando os cristais de gelo (CIVATTI et al., 2014).

Métodos de criopreservação têm sido desenvolvidos pela Embrapa, no que diz respeito a armazenar as sementes por longo prazo. Nesse caso é importante lembrar que as características das sementes tais como a umidade e a resistência a baixas temperaturas podem afetar a viabilidade. Assim é possível classificar as sementes de determinadas espécies, de acordo com a sua capacidade de tolerar a desidratação, sendo assim mais fácil desenvolver estratégias para viabilizar a criopreservação (PILATTI et al., 2011). Para aquelas espécies que não são resistentes à desidratação não é possível aplicar essa estratégia e outros protocolos são necessários.

Entre alguns exemplos clássicos de aplicação da criopreservação é citado o cacau, que é uma árvore comercialmente importante com grande demanda de consumo mundial, em que a criopreservação em nitrogênio líquido garante a conservação segura a longo prazo (FANG *et al.*, 2004). Estudos mais recentes de criopreservação tem sido realizados sobre germoplasma da espécie *Agave peacockii* ameaçada de extinção no México (DELGADO-ACEVES *et al.*, 2022) utilizando-se a técnica de vitrificação; de suspensões celulares da espécie medicinal *Polyscias filicifolia* recuperadas com estabilidade de produção em biorreatores, após 5 anos de criopreservação em nitrogênio líquido ( $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) (TITOVA *et al.*, 2021); de yacon (*Smallanthus sonchifolius*), para preservação por longos períodos, utilizando-se técnica de vitrificação

(HAMMOND *et al.*, 2021) e de protocórnios de *Dendrobium nobile* (ZANG *et al.*, 2021).

## 4.2. PRINCÍPIOS DOS MÉTODOS DE CRIOPRESERVAÇÃO

Os métodos mais utilizados na criopreservação de materiais vegetais são: desidratação, encapsulamento-desidratação, desidratação em crioplacas, vitrificação, vitrificação em gotículas, vitrificação em crioplacas, vitrificação em placas de malha de aço inoxidável. Nessa seção serão feitas considerações sobre os princípios de cada método. Exemplos de protocolos específicos e mais detalhados, para cada tipo de material vegetal, serão mostrados no item 4.3.

### 4.2.1 Desidratação

Neste método o material vegetal é submetido a um processo de desidratação antes de ser congelado em nitrogênio e é utilizado na criopreservação de sementes, embriões zigóticos e eixos embrionários de várias espécies tropicais recalcitrantes e intermediárias. (ENGELMANN E DUSSERT, 2013). Materiais vegetais como pólen e as sementes ortodoxas, sofrem desidratação naturalmente durante o processo de maturação. Materiais como embriões, pontas de ramos, suspensões celulares e calos, por possuírem maior quantidade de água nas células, são desidratados através dos métodos de desidratação ao ar livre, desidratação osmótica, imersão em soluções contendo altas concentrações de crioprotetores e congelamento lento em freezer programável.

Esses métodos provocam a máxima saída de água das células, concentrando o suco celular e fazendo com que a água remanescente fique no estado vítreo, induzindo a vitrificação, ou seja, os solutos ficam em maior quantidade dentro da célula, tornando seu interior viscoso, impedindo a formação de cristais de gelo no interior da célula,

durante o processo de imersão no nitrogênio líquido, mas mantendo um nível de hidratação mínimo, para manter a viabilidade do material, após o descongelamento. O teor de água que garante a maior taxa de sobrevivência dos explantes varia de 10-20% (ENGELMANN E DUSSERT, 2013). As variações do método de desidratação são o encapsulamento-desidratação e a desidratação em crioplaca (método D-crioplaca) descritos no item 4.3.9.5.

#### **4.2.2 Congelamento lento em freezer programável**

Engelmann e Dussert (2013) afirmam que a desidratação induzida por congelamento lento em freezer programável é um método clássico aplicado na criopreservação de espécies de regiões mais frias, como gemas dormentes, ápices de espécies tolerantes ao frio e culturas celulares como suspensões e calos indiferenciados. As amostras são submetidas aos tratamentos de pré-crescimento em meios de cultura contendo sacarose e/ou sorbitol, que induzem a perda de água do material por plasmólise e na sequência são expostas às soluções de crioprotetores, resfriamento lento com a diminuição da temperatura até  $-40^{\circ}\text{C}$ , na taxa de  $0,1$  a  $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$  e imersão no nitrogênio líquido. A diminuição lenta da temperatura converte a água da solução presente nos espaços intercelulares, que é menos concentrada em solutos do que a água presente no interior das células, em cristais de gelo, que uma vez formados no espaço intercelular induzem a saída de água das células e a desidratação. A desidratação induz o aumento da concentração do suco celular e faz com que a água passe para o estado vítreo (nem sólido e nem líquido), o que dificulta a formação de cristais de gelo dentro das células. A desidratação nesse caso ocorre antes e durante a criopreservação, durante a formação de cristais de gelo nos espaços intercelulares e a recuperação do material é feita através do descongelamento rápido.

#### **4.2.3. Vitrificação**

Neste método, o material vegetal é imerso em uma solução crioprotetora e congelado rapidamente em nitrogênio líquido e é considerado um dos mais eficientes para a conservação de sementes e embriões somáticos (REED et al., 2018). As técnicas de vitrificação induzidas pela desidratação ao ar livre ou em soluções contendo altas concentrações de crioprotetores, antes da imersão em nitrogênio líquido, são as mais utilizadas na crioproteção e mais adequadas às espécies tropicais, por serem de fácil manipulação, não requerem muitos equipamentos, são eficientes, de baixo custo e asseguram alto nível de sobrevivência e alto percentual de regeneração das amostras, após a imersão em nitrogênio líquido (ENGELMANN E DUSSERT, 2013).

As soluções de vitrificação mais utilizadas são a PVS2 (SAKAI et al., 1990) e a PVS3 (NISHIZAWA et al. 1993). A solução PVS2 é composta por uma mistura de vários agentes crioprotetores (30% glicerol + 15% etileno glicol + 15% dimetilsulfóxido (DMSO) + em meio de cultura contendo 0.15 M de sacarose) e a solução de PVS3 é composta por 50% glicerol + 50% sacarose. Essas soluções viscosas penetram nas células, fazendo com que a água fique em estado vítreo, dificultando a formação de cristais de gelo. As elevadas concentrações dos compostos utilizados nas soluções de vitrificação e a utilização de soluções pré-resfriadas, em temperaturas bem baixas, tornam estável o resfriamento, evitando a formação de cristais de gelo, além de restringir a difusão intensa de produtos de dentro da célula, como a água e solutos, por aumentarem a concentração do suco celular e impedirem a desidratação intensa das células (BENSON, 1994; ENGELMANN E DUSSERT, 2013).

O método da vitrificação apresenta variações como a vitrificação dos explantes em gotículas de soluções de vitrificação colocadas sobre tiras de papel alumínio (droplet vitrification) e vitrificação em crioplacas (método V-crioplaca).

#### **4.2.4. Vitrificação em gotículas**

O material vegetal é colocado em gotículas de solução de vitrificação pingadas sobre uma tira de papel alumínio (5 x 20 mm), que é imersa rapidamente em nitrogênio líquido (Figuras 1A e 2A). Esse método é vantajoso, pois os explantes ficam em contato direto com o nitrogênio líquido, o que garante altas taxas de resfriamento, de reaquecimento e, ao mesmo tempo, a crioproteção pela solução de vitrificação (ENGELMANN E DUSSERT, 2013). Há variações desse protocolo, em que o material vegetal é previamente imerso em uma solução de sacarose e glicerol por 20 min, seguido da exposição à solução de vitrificação, em baixa temperatura antes da transferência para as gotículas de solução de vitrificação, depositadas sobre a tira de papel alumínio. Em seguida a tira de papel alumínio contendo as gotículas com os explante é imersa rapidamente em nitrogênio líquido antes de ser transferida para o criotubo, contendo nitrogênio líquido, que depois será imerso no nitrogênio líquido do tanque criogênico (WANG et al. 2021).

#### **4.2.5. Vitrificação em crioplaca (V-crioplaca, D-crioplaca, Placa de malha de aço inoxidável)**

Nos métodos V-crioplaca (Figura 2B) e D-crioplaca (Figura 2C) o material vegetal é colocado sobre crio-placas de alumínio (7x37x0,5 mm), contendo 10 orifícios, contendo 2 µl de alginato de cálcio, que tem a função de facilitar a adesão do material vegetal à crioplaca. Em seguida é realizado o procedimento de vitrificação do material vegetal (método V-crioplaca, Figura 2B) ou de desidratação ao ar (método D-crioplaca, Figura 2C). Portanto, o método V-crioplaca combina o método de encapsulamento-vitrificação com a vitrificação em gotículas e o método D-crioplaca combina o encapsulamento em alginato na crioplaca com a desidratação ao ar livre (WANG *et al.*, 2021).

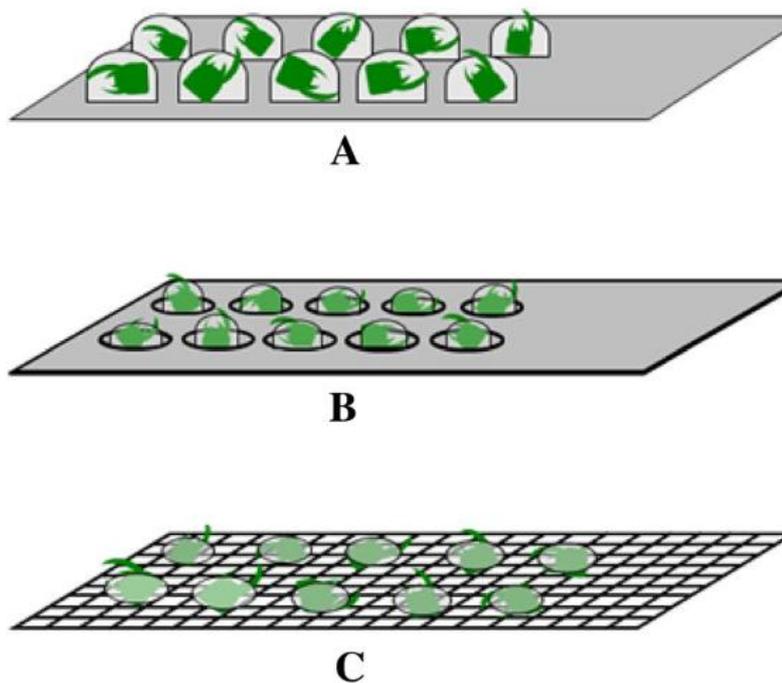
O método V-crioplaca foi desenvolvido por Yamamoto *et al.* (2011) para criopreservação de *Tanacetum cinerarrifolium*, uma espécie de crisântemo. Nesse método V crioplaca a solução de meio de cultura contendo 2 % de alginato é colocada nos orifícios da crio-placa, o material vegetal é imerso nessa solução e sobre ele é colocada a solução contendo meio de cultura, 0,4 M de sacarose e 0,1 M de cálcio para induzir a polimerização do alginato e encapsulamento em alginato de cálcio. A crio-

placa é transferida para um recipiente contendo uma solução de 2 M de glicerol e 1,4 M de sacarose, por 20 min e em seguida essa solução é substituída pela solução de vitrificação, por cerca de 40 min e a crioplaca transferida para o criotubo de 2 ml, que é então imerso no nitrogênio líquido.

O método D-crioplaca foi utilizado pela primeira vez com sucesso em 2013 na criopreservação de pontas de ramos de *Juncus decipiens* (NIINO *et al.*, 2013). O procedimento é idêntico ao V crioplaca até a etapa em que a crio-placa é transferida para a solução de glicerol e sacarose. Em seguida, nesse método a crio-placa é seca com papel filtro, mantida para desidratação ao ar livre, no fluxo laminar, por 2-3 h e em seguida transferida para o criotubo, que é então imerso no nitrogênio líquido (WANG *et al.*, 2021).

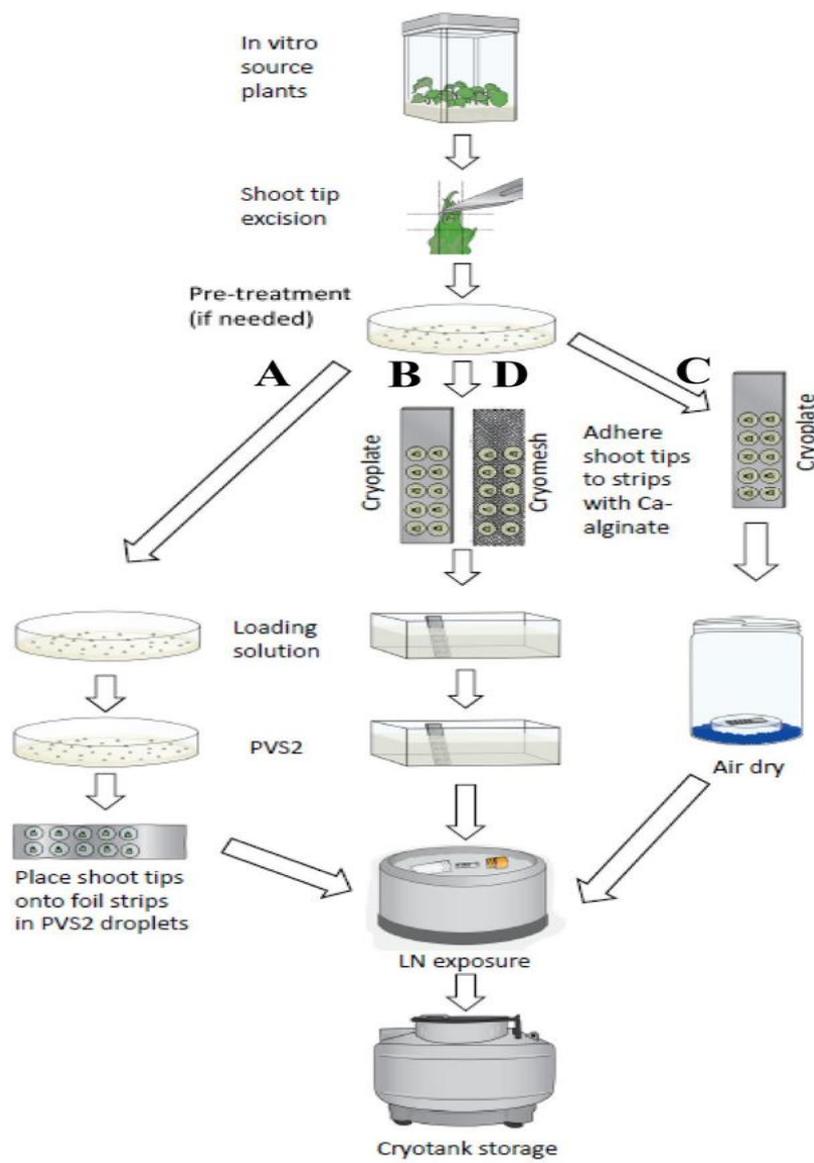
O método de criopreservação sobre placa de malha de aço inoxidável foi descrito por Funnekotter *et al.* (2017) e é semelhante ao método Vcrioplaca, incluindo as etapas de imersão na solução de carregamento contendo glicerol e sacarose, seguida da vitrificação em PVS2 e imersão em nitrogênio líquido (Figura 2D). A diferença é que o material vegetal é colocado sobre uma tira de malha de aço inoxidável de 25 × 7 mm (comprimento × largura) e possui aberturas de 0,4 mm, com diâmetro de fio de 0,224 mm (YAMAMOTO *et al.*, 2011) (Figura 2D). A vantagem desse método é o resfriamento mais rápido das amostras, uma vez que se trata de uma rede de fios de aço inoxidável de 0,224 mm e as aberturas da malha são de 0,4 mm, o que permite maior superfície de contato do explante com o nitrogênio líquido do que na placa de alumínio (WANG *et al.*, 2021).

Figura 1. Detalhes das placas utilizadas nos diferentes tipos de vitrificação nos artigos de criopreservação: (A) vitrificação em gotículas de 15 µl sobre tiras de papel alumínio de 5 x 20 mm. (B) vitrificação em crio-placas de alumínio de 7 x 37 x 0,5 mm, com orifícios e 1,0 x 0,5 mm ou 1.5 x 0,75 mm. (C) vitrificação em placas de malha de aço inoxidável de 7 x 25 mm, aberturas de 0,4 mm, diâmetro do fio de aço inoxidável de 0,224 mm.



Fonte: Wang *et al.* (2021), segundo esses autores redesenhada a partir de Panis *et al.* (2005), Yamamoto *et al.* (2011) e Funnekotter (2017)

Figura 2. Etapas da criopreservação utilizadas na vitrificação em gotículas sobre tiras de papel alumínio (A, Panis *et al.* 2005). Vitrificação em placa de alumínio V-crio-placa (B, Yamamoto *et al.* 2011). Vitrificação em placas de alumínio utilizando a desidratação ao ar em recipiente fechado, com sílica gel e adesão dos explantes à placa com alginato de cálcio (C, Niino *et al.* 2013). Vitrificação em placa de malha de aço inoxidável (D, Funnekotter *et al.* 2017).



Fonte: Wang *et al.* (2021), segundo os autores figura redesenhada a partir de Panis *et al.* (2005), Yamamoto *et al.* (2011) e Funnekotter *et al.* (2017).

#### 4.2.6 Encapsulamento, encapsulamento-desidratação e encapsulamento-vitrificação

No método de encapsulamento simples, os explantes são encapsulados em gotas de uma matriz de alginato de cálcio e imersos em nitrogênio líquido. O encapsulamento visa minimizar os danos mecânicos causados aos explante e facilitar a manipulação, durante as etapas da criopreservação e descongelamento. No encapsulamento-desidratação, método aplicado a embriões e ápices, os explantes são encapsulados em alginato de cálcio, passam por pré-crescimento em meio de cultura contendo sacarose, desidratação com sílica gel, para diminuir o teor de água para 20% da massa fresca e

imersos em nitrogênio líquido, e no encapsulamento-vitrificação os explantes encapsulados em alginato de cálcio são expostos aos protocolos utilizando as soluções de vitrificação e uma função do encapsulamento seria proteger o material vegetal do contato direto com as soluções de vitrificação, devido à toxicidade dessas soluções (ENGELMANN E DUSSERT, 2013).

#### **4.3.MATERIAIS VEGETAIS E MÉTODOS DE CRIOPRESERVAÇÃO UTILIZADOS NOS ARTIGOS CIENTÍFICOS PUBLICADOS NA PCTOC E CRYOLETTERS NO PERÍODO 2018-2022**

A Tabela 1 mostra a lista dos 46 artigos científicos sobre criopreservação publicados no período 2018 a 2022 no periódico Plant Cell Tissue and Organ Culture (PCTOC) e a Tabela 2 os 31 artigos publicados no periódico Cryoletters. Em ambas as tabelas são mostradas as espécies estudadas, os países em que os trabalhos foram elaborados, o método de criopreservação utilizado, o material vegetal criopreservado, a importância das espécies estudadas e as referências.

Nos subitens (4.3.1 a 4.3.12) abaixo serão feitas considerações específicas sobre os materiais vegetais e os métodos de criopreservação utilizados. No item 4.4 analisaremos quantitativamente os outros parâmetros pertinentes que permitirão concluir quais foram os países que mais publicaram, quais as espécies mais estudadas, as técnicas mais utilizadas e as perspectivas para o Brasil e o mundo.

Tabela 1. Artigos sobre criopreservação de plantas publicados no periódico Plant Cell Tissue and Organ Culture (Springer) no período 2018-2022.

ESPÉCIES	PAÍS	MÉTODOS	MATERIAL	REFERÊNCIAS	USO
<i>Asparagus officinalis</i>	Espanha	Encapsulamento-desidratação	Gemas de rizomas	Carmona-Martin et al. (2018)	Rizoma/Alimentação
<i>Vaccinium corymbosum</i>	China	Vitrificação em gotículas	Gemas adventícias de folhas	Chen et al. (2018)	Frutífera/alimentação
<i>Pinus radiata</i>	Chile	Crioprotetores, -80°C	Culturas celulares embriogênicas	Lineros et al. (2018)	Florestal/madeira
<i>Picea abies</i>	Finlândia	Vitrificação	Calos	Viljamaa et al. (2018)	Florestal /madeira
<i>Lotus tenuis</i>	Argentina	Encapsulamento-desidratação, encapsulamento-vitrificação e vitrificação	Gemas adventícias de folhas	Espasandin et al. (2018)	Forrageira/biorremediação do solo
<i>Dendrobium nobile</i>	China	Vitrificação	Protocórmios	Jian et al. (2019)	Ornamental
<i>Chrysanthemum</i>	Polônia	Encapsulamento-desidratação	Pontas de ramos	Kulus et al. (2019)	Ornamental
<i>Actinidia chinensis var. chinensis</i>	Nova Zelândia	Vitrificação em gotículas	Pontas de ramos	Mathew et al. (2019)	Frutífera
<i>Ribes nigrum</i>	Finlândia	Congelamento lento em freezer programável	Segmentos de caules com gemas	Rantala et al. (2019)	Frutífera
<i>Paeonia lactiflora</i>	China	Imersão direta em NL	Polen	Ren et al. (2019)	Ornamental
<i>Passiflora suberosa</i>	Brasil França	Vitrificação V-crioplaca-	Pontas de ramos	Vianna et al. (2019)	Frutífera, ornamental, medicinal
<i>Potato sp.</i>	Peru	Vitrificação de gotículas	Pontas de ramos	Vollmer et al. (2019)	Tubérculo
<i>Dracocephalum austriacum</i>	Áustria	Vitrificação de gotículas	Pontas de ramos	Rasl et al. (2020)	Ameaçada de extinção
<i>Paeonia suffruticosa</i>	China	Imersão direta em NL	Polen	Ren et al. (2020)	Ornamental
<i>Allium cepa var. Aggregatum</i>	China	Vitrificação em gotículas	Pontas de ramos	Wang et al. (2020)	Bulbos
Revisão	EUA	Tecnologias de criopreservação de pontas de ramos	Pontas de ramos	Bettoni et al. (2021)	Várias espécies
<i>Cirsium hillii</i>	Canadá	Vitrificação em gotículas	Pontas de ramos	Bi et al. (2021)	Ameaçada de extinção
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Turquia	Vitrificação	Plântulas	Ekinci et al. (2021)	Pesquisa
<i>Stewartia sps</i>	EUA	Crioprotetor, -80C	Culturas celulares embriogênicas	Gladfelter et al.	Ornamental/medicinal

				(2021)	
<i>Smallanthus sonchifolius</i>	República Tcheca	Osmotic dehydration, vitrificação em gotículas	Gemas apicais	Hammond et al. (2021)	Tubérculos/Alimentação
<i>Lamprocapnos spectabilis</i>	Polónia	Encapsulamento-vitrificação	Pontas de ramos	Kulus and Tymoszuk (2021)	Alimentação
<i>Tulipa tarda</i>	Polónia	Vitrificação em gotículas	Meristema apical	Másłanka and Szewczyk (2021)	Ornamental
<i>Persea americana</i>	Austrália	Vitrificação em gotículas	Pontas de ramos	O'Brien et al. (2021)	Frutífera
<i>Phoenix dactylifera</i>	Brasil EUA	Imersão direta em NL	Pólen	Oliveira et al. (2021)	Frutífera
Revisão	França	Criopreservação e bancos de germoplasma <i>in vitro</i>	Bancos de germoplasma <i>in vitro</i>	Ochatt et al. (2021)	Várias espécies
<i>Actinidia</i> spp.	Nova Zelândia	Vitrificação em gotículas	Pontas de ramos	Pathirana et al. (2021)	Frutífera
<i>Pinus koraiensis</i>	China	Crioprotetores, -80°C	Tecido embriogênico	Peng et al. (2021)	Florestal ameaçada de extinção
Revisão	Coreia	Bancos criogênicos de raízes	Raízes	Popova et al. (2021)	Várias espécies
<i>Ribes nigrum</i>	Finlândia	Vitrificação em gotículas	Pontas de ramos	Rantala et al. (2021)	Frutífera
<i>Bactris gasipaes</i>	Brasil Itália	Vitrificação em gotículas	Culturas embriogênicas	Ree and Guerra (2021)	Frutífera
<i>Physalis angulata</i>	México EUA	Vitrificação em gotículas	Pontas de ramos	Romo-Paz et al. (2021)	Frutífera
<i>Hovenia dulcis</i>	Brasil	V-crioplaca, vitrificação em gotículas	Pontas de ramos	Saavedra et al. (2021)	Medicinal
<i>Gentiana kurroo</i>	Índia	Vitrificação, vitrificação em gotículas	Pontas de ramos	Sharma et al. (2021)	Medicinal ameaçada de extinção
<i>Ensete glaucum</i>	Índia	Desidratação ao ar livre	Sementes e embriões zigóticos	Singh et al. (2021)	Frutífera
<i>Allium sativum</i>	Japão	D-crioplaca	Pontas de ramos	Tanaka et al. (2021)	Bulbos
Revisão	EUA	Criopreservação de gemas de plantas lenhosas em larga escala	Gemas de plantas lenhosas	Tanner et al. (2021)	Várias espécies
<i>Polyscias filicifolia</i>	Rússia	Congelamento lento em freezer programável	Suspensões celulares	Titova et al. (2021)	Medicinal ameaçada de extinção
Revisão	China	Progressos da criopreservação de propágulos originados <i>in vitro</i> : tecnologias e fontes de explantes	Diversos tipos	Wang et al. a (2021)	Várias espécies
<i>Allium cepa</i> var. <i>aggregatum</i>	Noruega	Vitrificação em gotículas	Pontas de ramos	Wang et al. b (2021)	Bulbos
<i>Dendrobium</i>	China	Vitrificação	Protocórmios	Zhang et al. a (2021)	Ornamental
<i>Arabidopsis</i>	China	Vitrificação	Plântulas	Zhang et al. b (2021)	Pesquisa

<i>thaliana</i>					
Revisão	Índia	Vitrificação, Encapsulamento-vitrificação Encapsulamento-desidratação	Cultura de tecidos e abordagens biotecnológicas	Arora et al. (2022)	Árvores medicinais (várias espécies)
<i>Agave peacockii</i>	México	Vitrificação em gotículas	Pontas de ramos (domos meristemáticos)	Delgado -Aceves et al. (2022)	Fibras ameaçada de extinção
<i>Agapanthus praecox</i>	China	Vitrificação	Culturas embriogênicas	Liu et al. (2022)	Ornamental
<i>Paeonia emodi</i>	China	Desidratação	Sementes	Ren et al. (2022)	Ornamental
<i>Chrysanthemum morifolium</i>	China	Vitrificação	Gemas adventícias de gemas axilares	Su et al. (2022)	Ornamental

Tabela 2. Artigos sobre criopreservação de plantas publicados no periódico Cryoletters no período 2018-2022.

ESPÉCIES	PAÍS	MÉTODOS	MATERIAL	REFERÊNCIAS	USO
<i>Calophyllum antillanum</i>	Espanha	Imersão direta em nitrogênio líquido (NL)	Sementes	Entensa et al. (2022)	Florestal Medicinal
<i>Borassus flabellifer</i>	China	Desidratação	Embriões zigóticos	Han et al. (2021)	Florestal sementes recalcitrantes
<i>Pogostemon yatabeanus</i>	Coréia	Vitrificação em gotículas	Pontas de ramos	Lee et al. (2021)	Ameaçada de extinção
<i>Valeriana jatamansi</i>	Índia	Vitrificação	Pontas de ramos	Sharma et al. (2021)	Medicinal Ameaçada de extinção
<i>Cattleya sp</i>	Brasil	Desidratação	Sementes	Fileti et al. (2021)	Ornamental
<i>Lamprocapnos spectabilis</i>	Polônia	Encapsulamento - desidratação	Pontas de ramos	Kulus (2021)	Ornamental Medicinal
Revisão	Brasil	Perspectiva: criopreservação para melhoramento genético de plantas e conservação de recursos genéticos	Pólen	Dinato et al. (2020)	Várias species
<i>Citrus cavaleriei</i>	Índia	Desidratação, vitrificação, encapsulamento-desidratação	Embriões e eixos embionários	Malik et al. (2020)	Alimentaçãoameaçada de extinção
<i>Rhynchosyilis gigantea</i>	Tailândia	V-crioplaca	Pólen	Jitsopakul et al. (2020)	Ornamental

<i>Terammus labialis</i>	África do Sul	Imersão direta em NL	Sementes	Acosta et al. (2020)	Forrageira /biorremediação do solo
<i>Quercus sp.</i>	EUA	Vitrificação em gotículas	Pontas de ramos	Pence & Chaiken (2020)	Florestal
<i>Dioscorea prazeri</i>	Índia	Vitrificação, Encapsulamento – Vitrificação	Segmentos nodais Pontas de ramos	Thankappan & Morawala-Patel (2020)	Tubérculo
<i>Syzygium maire</i>	Nova Zelândia	Vitrificação em gotículas	Embriões zigóticos	Walt et al. (2020)	Florestal ameaçada de extinção
<i>Abelmoschus moschatus</i>	Índia	Imersão direta em NL	Pólen	Gowthami et al. (2020)	Medicinal
<i>Aquilaria malaccensis</i>	Índia	Desidratação, encapsulamento –desidratação	Embriões zigóticos e gemas axilares	Devi et al. (2019)	Florestal,sementes recalcitrantes ameaçada de extinção
<i>Clitoria ternatea</i>	Índia	Encapsulamento-desidratação	Gemas axilares	Nair et al. (2019)	Medicinal
<i>Terammus labialis</i>	Cuba	Imersão direta em NL	Sementes	Acosta et al. (2019)	Alimentação
<i>Vitis aestivalis, Vitis jacquemontii</i>	Brasil EUA	Desidratação-vitrificação em gotículas, V-crioplaca	Pontas de ramos	Bettoni et al. (2019)	Frutífera
<i>Aster altaicus var. uchiyamae kitam</i>	Rússia	Vitrificação em gotículas	Pontas de ramos	Choi et al. (2019)	Ameaçada de extinção
<i>Cleome spinosa</i>	Brasil	Vitrificação e V-crioplaca	Pontas de ramos	Vilardo et al. (2019)	Medicinal
<i>Cannabis sativa</i>	EUA	V-crioplaca e vitrificação em gotículas	Gemas axilares	Lata et al. (2019)	Medicinal
<i>Vanilla siamensis</i>	Thailândia	Encapsulamento – desidratação e Vitrificação	Protocórmios	Chaipanich et al. (2019)	Aromática. Alimentação, ameaçada de extinção
<i>Tussilago farfara</i>	Alemanha	Vitrificação em gotículas	Pontas de ramos	Hambeck et al. (2019)	Medicinal
<i>Ipomoea batatas</i>	África do	Vitrificação	Gemas axilares	Manamela e Mycock	Tubérculo alimentação

	Sul			(2019)	
Revisão	Reino Unido	Encapsulamento em alginate para aprimorar a biopreservação e sucesso: uma revisão multidisciplinar das idéias atuais e aplicações em criopreservação e em armazenamento sem congelamento	Vários tipos	Benson et al. (2018)	Várias espécies
<i>Elaeis guineensis</i>	França	Desidratação	Embriões somáticos	Beulé et al. (2018)	Alimentação, conservação de germoplasma
<i>Artemisia laciniata</i>	Áustria	Vitrificação em gotículas	Pontas de ramos	Kodym et al. (2018)	Medicinal ameaçada de extinção
<i>Malus domestica</i>	Dinamarca	Imersão direta em NL	Gemas	Vogiatzi et al. (2018)	Frutífera
<i>Vitis sp.</i>	EUA	Vitrificação em gotículas	Pontas de ramos	Volk et al. (2018)	Frutífera
<i>Mentha spp.</i>	Alemanha	Vitrificação	Pontas de ramos	Senula et al. (2018)	Medicinal
<i>Zea mays</i>	Cuba	Imersão direta em NL	Sementes	Arguedas et al. (2018)	Cereais

Nos subitens 4.3.1 a 4.3.12 abaixo serão feitas considerações específicas sobre os diferentes materiais vegetais estudados e os respectivos métodos de criopreservação relatados nos artigos científicos citados nas Tabelas 1 (PCTOC) e 2 (Cryoletters).

#### **4.3.1 Pólen**

A Tabela 1 mostra os artigos sobre criopreservação de grãos de pólen das espécies ornamentais *Paeonia lactiflora* (REN *et al.* 2019), *Paeonia suffruticosa* (REN *et al.* 2020) e *Phoenix dactylifera* (OLIVEIRA *et al.* 2021), que foram criopreservados, através da imersão direta em nitrogênio líquido.

No periódico Cryoletters (Tabela 2) foram registrados no período de 2018 -2022, além da revisão de Dinato *et al.* (2020), sobre a criopreservação de pólen de espécies brasileiras pelos métodos de desidratação osmótica, desidratação ao ar livre e vitrificação, outras espécies como *Abelmoschus moschatus* (imersão direta em nitrogênio líquido) (GOWTHAMI *et al.* 2020) *Rhynchosstylis gigantea* (V-crioplaca) também foram usadas (JITSOPAKUL *et al.* 2020).

A imersão direta em nitrogênio líquido foi a estratégia mais simples utilizada, aplicada a materiais que naturalmente apresentam teores de água ao redor ou abaixo de 10% da biomassa fresca, mas outras técnicas envolvendo desidratação osmótica ou ao ar livre e vitrificação foram necessárias para outras espécies, dependendo do teor de água dos grãos de pólen. Os resultados indicam a necessidade de se adotar a estratégia adequada ao teor de água inicial dos grãos de pólen.

#### **4.3.2 Sementes**

Na criopreservação de sementes das espécies de *Paeonia emodi* (REN *et al.* 2022) (Tabela 1) o pré-tratamento de desidratação a 30°C, por 7 a 48 horas seguido da imersão em nitrogênio líquido garantiu a mesma porcentagem de germinação, entre 80 e 100%

que as sementes não criopreservadas e teores de umidade que variaram entre 15,25% e 7,07%. Da mesma forma as sementes de *Ensete glaucum* (uma espécie de banana selvagem) toleraram o pré-tratamento de desidratação ao ar livre, com 5-10% de teor de umidade. Portanto, sementes, com 10% de teor de umidade e embriões zigóticos com 12% de teor de umidade foram criopreservados com sucesso, mantendo 80% e 83% de viabilidade, respectivamente (SINGH *et al.* 2021). Esses protocolos são bastante simples por requererem apenas a desidratação das sementes, para a redução do teor de umidade requerido para tolerarem a criopreservação.

Na Cryoletters (Tabela 2) foram registrados os artigos de criopreservação de sementes de *Calophyllum antillanum*, árvore medicinal cuja sementes apresentam 6% de teor de água (ENTENSA *et al.* 2022); *Teramnus labialis* (ACOSTA *et al.* 2019, 2020), *Zea mays* (ARGUEDAS *et al.* 2018), por imersão direta em nitrogênio líquido e de *Cattleya* sp. (FILETI *et al.* 2021), por desidratação.

#### 4.3.3 Embriões zigóticos e somáticos

Os artigos sobre a criopreservação de embriões zigóticos foram encontrados apenas no periódico Cryoletters (Tabela 2). Embriões zigóticos de *Borassus flabellifer* foram criopreservados através da desidratação (HAN *et al.* 2021); embriões zigóticos de *Aquilaria malaccensis*, árvore com sementes recalcitrantes, através de desidratação e encapsulamento-desidratação (DEVI *et al.* 2019); embriões zigóticos de *Syzygium maire*, árvore ameaçada de extinção, por vitrificação em gotículas (WALT *et al.* 2020); embriões e eixos embrionários de *Citrus cavaleriei*, espécie selvagem ameaçada de extinção, pelos métodos de desidratação, vitrificação e encapsulamento-desidratação (MALIK *et al.* 2020). Embriões somáticos de 28 clones de *Elaeis guineenses* foram criopreservados durante 20 anos, após o pré-crescimento, por 7 dias em meio contendo 0,75 M de sacarose, para induzir a desidratação osmótica, que foi seguida da desidratação ao ar, em recipientes fechados contendo sílica gel e redução do teor de umidade entre 19-35%, com sobrevivência de 33,2% (BEULÉ *et al.* 2018).

#### 4.3.4 Protocórmios

A Tabela 1 cita o artigo em que os protocórmios de orquídeas *Dendrobium nobile* (JIAN *et al.* 2019, ZHANG *et al.* 2021a) foram criopreservados pelo método de vitrificação, sendo pré-cultivados em meio contendo 0,3 M de sacarose, a 4°C por 48 horas, para induzir a desidratação osmótica e em seguida transferidos para uma outra solução contendo 2 M de glicerol e 0,4 M de sacarose por 40 min, que deve ter potencializado ainda mais a perda de água dos protocórmios. Após 40 min essa solução foi removida e substituída por uma solução crioprotetora de vitrificação PVS2 contendo 30% de glicerol, 15% de DMSO (dimetilsulfóxido), 15% de etileno glicol e 0,4 M de sacarose, por 40 minutos a 0°C, após o que os criotubos foram imersos em nitrogênio líquido por 30 min. Em seguida foram removidos do nitrogênio líquido e transferidos para um banho maria a 42°C por 1 min (descongelamento rápido). Na Cryoletters (Tabela 2) é mostrado o artigo em que protocórmios de *Vanilla siamensis* (CHAIPANICH *et al.* 2019) foram criopreservados pelas técnicas de encapsulamento-desidratação e vitrificação.

O protocolo utilizado para *Dendrobium nobile* acima consta então da osmoproteção, induzida pela solução sacarose/glicerol e da desidratação osmótica e vitrificação, induzida com a solução de PVS2. O descongelamento rápido em banho maria tem a função de evitar a possível formação de cristais de gelo dentro das células durante o aquecimento na temperatura ambiente. É importante ressaltar que o glicerol, o etilenoglicol e o DMSO da solução de vitrificação alteram as propriedades coligativas da água, dificultando a formação de gelo dentro das células.

#### 4.3.5 Plântulas

Plântulas de *Arabidopsis thaliana* após 48 e 72 h de germinação foram criopreservadas por vitrificação, sendo transferidas para a solução de carregamento, contendo 2 M glicerol e 0,4 M de sacarose a 25°C por 20 min, para induzir a desidratação osmótica e osmoproteção e transferidas para a solução PVS2 contendo

30% de glicerol, 15% de etilenoglicol, 15% de DMSO e 0,4 M de sacarose 50 min, seguido da imersão rápida em nitrogênio líquido por uma hora e do descongelamento rápido em banho maria a 40°C, por 90 segundos (EKINCI *et al.* 2021, ZHANG *et al.* 2021b) (Tabela 1). Aqui foi utilizado um protocolo semelhante ao utilizado para protocórmios, que constou de osmoproteção e da desidratação osmótica seguida da vitrificação com a solução de PVS2. No periódico Cryoletters não foram encontrados artigos sobre criopreservação de plântulas no período 2018-2022.

#### 4.3.6 Raízes

A revisão sobre bancos de germoplasma de raízes criopreservadas, publicada no periódico PCTOC por Popova *et al.* (2021), artigo citado na Tabela 1 é uma evidência da importância da criogenia para conservação de raízes de plantas de potencial interesse para as indústrias farmacêuticas, de cosméticos e produtoras de suplementos naturais na área da saúde. Os autores relatam que a criopreservação de raízes tem sido utilizada com sucesso em um grande número de espécies, com objetivo de armazenar, em bancos de germoplasma, raízes isoladas de plantas crescidas *in vitro* e culturas de raízes em cabeleira de importância comercial, como fontes de produção de compostos bioativos de plantas, com potencial de aplicação industrial. Os estudos indicam que nenhum impacto negativo foi registrado no crescimento, na biossíntese e na estabilidade genéticas das raízes criopreservadas. Exemplos de espécies para as quais foram desenvolvidos protocolos são relatados nessa revisão para os diferentes tipos de origem das raízes.

Os autores afirmam que os tipos de explantes utilizados foram pontas de raiz ou segmentos de raiz e os métodos de criopreservação utilizados variaram de acordo com a espécie e a origem das raízes utilizadas. Raízes excisadas de plantas crescidas *in vitro* foram criopreservadas nas espécies *Cleome rosea*, *Hypericum perforatum*, *Passiflora pohlii*, *Solanum tuberosum*, *Vanilla planifolia*, através dos métodos de vitrificação, vitrificação em gotículas, V-crio-placa e utilização de crioprotetores seguida de congelamento. As raízes originárias de culturas *in vitro* de raízes adventícias foram criopreservadas para as espécies *Hyoscyamus niger* (vitrificação), *Panax ginseng*

(vitrificação e vitrificação em gotículas) e *Tarenaya rosea* (encapsulamento-vitrificação).

As raízes originárias de raízes em cabeleira, induzidas após a transformação do explante com *Agrobacterium rhizogenes* foram utilizadas no maior número de artigos científicos (19) e foram criopreservadas predominando os métodos de vitrificação em gotículas (*Fagopyrum tataricum*, *Nepeta cataria*, *Phytolacca esculenta*, *Rubia akane*, *Scrophularia buergeriana*); encapsulamento-vitrificação (*Astragalus membranaceus*, *Eruca sativa*, *Gentiana macrophyla*); encapsulamento-desidratação (*Ajuga reptance*, *A Armoracia rusticana*, *Decalepis arayalpathra*, *Maesa lanceolata*, *Medicago truncatula*, *Vinca minor*), vitrificação (*Atropa belladonna*, *Decalepis arayalpathra*, *Maesa lanceolata*, *Medicago truncatula*, *Panax ginseng*); apenas em 3 artigos é relatado o uso do freezer programável (*Artemisia annua*, *Beta vulgaris*, *Nicotiana rustica*). Portanto, os métodos de vitrificação e suas variações foram os utilizados na maioria dos casos e o menos utilizado foi o freezer programável, que é o método mais caro. É importante ressaltar que o método mais simples representado pelo encapsulamento-desidratação foi utilizado em apenas 6 espécies.

Os autores constataram que os métodos de encapsulamento-desidratação, encapsulamento-vitrificação e vitrificação em gotículas foram os mais eficazes na preservação de raízes e que o encapsulamento em alginato protege as pontas das raízes contra os danos mecânicos e osmóticos, que podem prejudicar o crescimento posterior no meio de cultura, após o descongelamento. Outro fato importante mencionado é que a vitrificação em gotículas permite o contato mais eficiente do explante com a solução de vitrificação, tornando mais rápido o resfriamento e o aquecimento, etapas que são críticas para materiais vegetais mais hidratados e sensíveis à perda de água por processos osmóticos como as raízes. Relatam ainda que para as raízes as etapas de pré-cultura e osmoproteção, com soluções concentradas de sacarose ou sorbitol são as etapas mais críticas no processo de criopreservação das raízes, uma vez que a desidratação osmótica pode danificar os tecidos sensíveis das pontas das raízes.

#### **4.3.7 Meristema apical**

No periódico Cryoletters não foram encontrados artigos sobre criopreservação de meristemas apicais.

No artigo publicado por Másłanka e Szewczyk (2021) e citado na Tabela 1 os meristemas apicais de *Tulipa tarda* foram criopreservados através de vitrificação em gotículas sobre papel alumínio. Os meristemas foram excisados de bulbilhos e imersos em solução contendo 2 M de glicerol e 0,4 M de sacarose por 20 min em temperatura ambiente e em seguida os meristemas foram imersos em solução de PVS2 contendo 0,4 M de sacarose, 30% de glicerol, 15% de etileno glicol e 15% de DMSO a 0°C, por períodos de 10, 20, 30, 45 e 60 min e em seguida foram colocados sobre tiras de papel alumínio de 20 mm x 5 mm, em uma gota da solução de PVS2. As tiras foram imersas diretamente no nitrogênio líquido e rapidamente transferidas para criotubos contendo o nitrogênio líquido, que foram então imersos no nitrogênio líquido por 1 h. Após esse período, os criotubos foram removidos no nitrogênio líquido e os meristemas transferidos para uma solução contendo 1,2 M sacarose (solução de descarregamento), em temperatura ambiente, por 15 min. Os meristemas foram então transferidos para papel filtro, para remoção do excesso da solução de carregamento e inoculados em meio de cultura.

Nesse protocolo os autores relatam que metade dos bulbos foi submetido a um tratamento a frio a 5°C por 10 semanas, antes da exposição dos ápices à solução de carregamento e à solução de vitrificação. Esse tratamento a frio melhorou significativamente as taxas de sobrevivência ao nitrogênio líquido e a recuperação da maioria dos meristemas apicais., o que mostra que em muitos casos a inserção de outros tratamentos ao protocolo do método padrão de criopreservação pode otimizar o processo.

#### **4.3.8 Gemas de rizomas, gemas adventícias de folhas, gemas axilares de segmentos de caule**

Vários protocolos foram utilizados nos artigos do periódico PCTOC, citados na Tabela 1, nos estudos sobre a criopreservação de gemas e esses protocolos variaram, dependendo da origem inicial das gemas.

Gemas de rizomas de *Asparagus officinalis* foram criopreservadas através do método de encapsulamento–desidratação. O artigo publicado por Carmona-Martin *et al.* (2018) no periódico Plant Cell Tissue and Organ Culture, as gemas esterilizadas foram incubadas em meio de cultura suplementado com 0,3 M de sacarose, a 25°C, por 24 e 48 horas e em seguida encapsuladas em solução contendo alginato a 3%, 0,4 M de sacarose e 2 M glicerol, polimerizadas em solução de 100 mM de cloreto de cálcio contendo 0,4 M de sacarose e 2 M de glicerol, por 30 min. As cápsulas foram dessecadas por 24 h em um frasco de 1000 ml contendo 100 g de sílica gel, cobertas com papel filtro, até atingirem conteúdo de água de 35% da massa fresca. Em seguida foram transferidas para criotubos, pré-congeladas por 1 h a 0°C, exposição por 1 h a -20°C e imersas em nitrogênio líquido. Após a criopreservação as gemas foram descongeladas e re-hidratadas em água destilada, em temperatura ambiente (descongelamento lento) e inoculadas no meio de cultura.

Nesse método as gemas de aspargos foram desidratadas primeiramente na solução 0,3 M de sacarose, antes do encapsulamento e em seguida submetidas à nova desidratação ao ar sobre em sílica gel, o que foi suficiente para reduzir o teor de água e resistirem à imersão em nitrogênio líquido. Esse protocolo só aparece em um dos artigos de criopreservação, mas é importante por ser relativamente simples, barato e menos trabalhoso. O encapsulamento em alginato tem a função de impedir o contato direto dos tecidos da gema com a solução de vitrificação, que é muito tóxica (ENGELMANN E DUSSERT 2013).

As gemas adventícias de folhas de *Vaccinium corymbosum* (mirtilo) foram criopreservadas por Chen *et al.* (2018), pelo método de vitrificação em gotículas (Tabela 1). As gemas adventícias induzidas por organogênese direta em segmentos de folhas foram removidas, através da excisão de pequenos segmentos de folhas de 2 mm x 3 mm, contendo de 4-6 gemas adventícias cada, que foram pré-cultivados em meio de cultura WPM contendo 0,3 M de sacarose, por 24 h, tratados, por 30 minutos, com a solução de carregamento, contendo 1M de sacarose e 2 M de glicerol e imersos na solução de vitrificação PVS2, por 40 min a 0°C. Em seguida, cada pequeno pedaço de folha desidratado foi transferido para tiras de papel alumínio de 30 mm esterilizadas, contendo cada uma 10 buracos pequenos, cada um deles contendo um segmento de folhas, foram cobertos com gotas da solução de PVS2 e em seguida as tiras de papel

alumínio foram imersas no nitrogênio líquido, por pelo menos 10 min. As tiras de papel alumínio congeladas foram removidas no nitrogênio líquido e imersas na solução de descarregamento, contendo meio de cultura WPM, 1,2 M de sacarose, em temperatura ambiente, por 20 min (descongelamento lento).

As gemas adventícias de segmentos de folhas (clusters de 6-8 gemas/segmento de folha) de *Lotus tenuis* foram criopreservadas por Espasadin *et al.* (2018), através dos métodos de encapsulamento–desidratação, encapsulamento–vitrificação e por vitrificação e a eficácia dos 3 métodos foi comparada no artigo científico.

No método de encapsulamento-desidratação segmentos de folhas contendo de 6-8 gemas adventícias foram encapsulados em solução de meio MS contendo 3 % de alginato de sódio e 0,1 M de sacarose e polimerizadas em solução 0,1 M de cloreto de cálcio, por 20 min. Em seguida as cápsulas foram desidratadas osmoticamente, em soluções de sacarose variando de 0,25 M a 0,75 M, mantidas em agitador horizontal por 24 h e depois foram colocadas sobre papel filtro, no fluxo laminar ou dentro de um dessecador contendo sílica gel, em temperatura ambiente, até o teor de água diminuir para 20%, por período de 4 a 6 h. As gemas desidratadas foram transferidas para os criotubos e imersas no nitrogênio líquido por 48 h, após o que os criotubos foram transferidos para banho maria a 40°C, por 3 min (descongelamento rápido) e as gemas removidas para meio de cultura MS contendo 0,1 M de sacarose. Nesse protocolo as cápsulas de alginato de cálcio contendo os segmentos de folhas com as gemas adventícias foram desidratadas nas soluções de sacarose e em seguida no fluxo laminar ou no dessecador, contendo sílica gel antes da imersão no nitrogênio líquido.

No encapsulamento-vitrificação as cápsulas de alginato de cálcio contendo as gemas foram transferidas para uma solução de vitrificação PVS3, por 60 min e imersas em nitrogênio líquido, por 48 h, após o que foram submetidas ao descongelamento rápido em banho maria, a por 40°C, por 3 min e lavadas em meio de cultura MS contendo 1,2 M de sacarose, antes da inoculação no meio de cultura.

No método de vitrificação, os segmentos não encapsulados de folhas contendo as gemas foram desidratados através da imersão direta na solução de carregamento, contendo meio de cultura MS com 2 M de glicerol e 0,4 M de sacarose, por 25 min em temperatura ambiente, em criotubos de 5 ml. Em seguida foram expostos à vitrificação em soluções com diferentes proporções de DMSO, glicerol, etileno glicol e sacarose

(PVS2, PVS3 e PVS4, a 0°C por 1 h e depois imersos no nitrogênio líquido, por 48 h e descongelados rapidamente em banho maria, por 3 min. Em seguida as gemas foram removidas da solução de PVS2 e transferidas para a solução de descarregamento de 1,2 M de sacarose em meio MS, por 30 min, em temperatura ambiente, após o que foram secas superficialmente sobre papel filtro, no fluxo laminar e inoculados em meio de cultura.

Entre os 3 métodos testados a vitrificação foi o protocolo mais eficiente no sentido de conferir a tolerância à criopreservação do que os demais tratamentos. O encapsulamento-desidratação foi efetivo em decrescer o teor de água para 16,3%, após 4 h de desidratação em fluxo laminar, enquanto a redução do teor de água foi menor nas cápsulas expostas à desidratação em sílica gel, pois permaneceram com 24,7% de teor de água, após 6 h de desidratação. Apesar de mais de 85% das gemas sobreviverem aos dois métodos de desidratação, não sobreviveram ao nitrogênio líquido, enquanto as cápsulas que foram imersas na solução de PVS3 (encapsulamento-vitrificação) sobreviveram à crioproteção, mas não toleraram a exposição ao nitrogênio líquido. Em contrapartida, alguns dos tratamentos de vitrificação das gemas não encapsuladas asseguraram até 79% de sobrevivência ao nitrogênio líquido, com a solução de PVS3 (50% glicerol, 50% sacarose), a solução mais simples utilizada. Esses resultados mostraram que a crioproteção das gemas submetidas à vitrificação direta, sem a barreira representada pela cápsula de alginato foi o método mais eficiente, por facilitar o contato direto das gemas com as altas concentrações de glicerol e sacarose, assegurar uma penetração mais eficiente desses compostos pelas células e tornar as velocidades de congelamento e descongelamento mais rápidas, dificultando a formação de gelo.

A criopreservação de gemas axilares de segmentos de caule de *Ribes nigrum* foi realizada por Rantala *et al.* (2019), através do congelamento lento, em freezer programável (Tabela 1) Segmentos de ramos (2 cm de comprimento) contendo uma gema axilar foram colocados em 1,8 ml criotubos fechados e armazenados em criocaixas a 0°C de um dia para outro. Em seguida, os criotubos foram resfriados de 0 a -38°C em um freezer programável na taxa de 0,17 C/min. Os criotubos foram mantidos a -38°C, por 40 min antes da imersão em nitrogênio líquido, após o que as gemas foram descongeladas em banho maria a 37°C, por 3 min, esterilizadas superficialmente em

etanol 70% por 20 s e rapidamente imersas em etanol puro, antes de serem transferidas para o meio de cultura.

Considerações especiais com relação à criopreservação de gemas de plantas lenhosas foram relatadas na revisão escrita por Tanner *et al.* (2021) e citada na Tabela 1. Nessa revisão, sobre a implementação em larga escala de criopreservação de gemas dormentes, os autores mencionam que a eficácia da criopreservação de gemas dormentes de árvores tem sido observada em várias espécies lenhosas decíduas como amêndoa, nozes, carvalho, macieira, apricot, videira, pera, pêssego, cereja, mirtilo, amoreira e em muitas outras espécies de plantas lenhosas, apresentando algumas vantagens, pois as gemas são obtidas diretamente do campo e não dependem das técnicas de cultura de tecidos para serem geradas, introduzidas *in vitro* e multiplicadas. Afirmam que, além disso os custos da aplicação de técnicas de criopreservação de gemas dormentes é dez vezes menor que a criopreservação de pontas de ramos de culturas *in vitro* e que estudos tem demonstrado que, quando se compara a criopreservação de germoplasma de maçã, usando gemas dormentes da planta com a criopreservação de pontas de ramos produzidos *in vitro* tendo sido observado que a criopreservação de gemas dormentes ocupa apenas 40% do tempo e 50% da mão de obra necessária para a criopreservação de pontas de ramos produzidos *in vitro*.

Na Cryoletters os artigos encontrados e citados na Tabela 2 foram sobre criopreservação de gemas axilares de *Clitoria ternatea* por encapsulamento-desidratação (NAIR *et al.* 2019), de *Cannabis sativa*, por V crioplaca e vitrificação em gotículas (LATA *et al.* 2019), *Ipomoea batatas*, por vitrificação (MANAMELA E MYCOK 2019) e *Mallus x domestica* por imersão direta em nitrogênio líquido (VOGIATZI *et al.* (2018).

#### **4.3.9 Pontas de ramos**

Pontas de ramos são explantes que incluem a gema apical e primórdios foliares cujo número pode variar dependendo do explante. Na criopreservação de pontas de ramos foi utilizado o método de encapsulamento-desidratação no artigo sobre *Chrysanthemum x grandiflorum* (KULUS *et al.* 2019) e essa técnica é mencionada

também na revisão sobre árvores de importância medicinal (ARORA *et al.* 2022). O método de vitrificação, em seus diferentes protocolos, foi utilizado na maioria dos artigos científicos publicados no período 2018-2022 e essa técnica é comparada com os métodos de encapsulamento-desidratação na revisão de Bettoni *et al.* (2021).

Bettoni *et al.* (2021) afirmam que atualmente a criopreservação de pontas de ramos é realizada, na maioria dos casos, através da vitrificação, em que a água é removida de dentro das células por processo osmótico, através de soluções altamente concentradas, incluindo a vitrificação em gotículas, encapsulamento-vitrificação, encapsulamento-desidratação, protocolo de congelamento em duas etapas, vitrificação em crioplacas e desidratação em crioplacas. As soluções de vitrificação mais utilizadas foram a PVS2 (SAKAI *et al.* 1990) contendo 30% de glicerol, 15% de etileno glicol, 15% de dimetilsulfóxido (DMSO) e 0,4 M de sacarose ou a PVS3, contendo 50% de sacarose e 50% de glicerol, utilizada quando os tecidos são sensíveis ao PVS2.

Na revisão recente de Wang *et al.* (2021) os autores apontam que vários bancos de criopreservação de germoplasma oficiais espalhados pelo mundo utilizam as técnicas de vitrificação em gotículas, V crioplaca (Vitrificação em crio-placa) e D-crio-placa (desidratação em crio-placa), para criopreservar pontas de ramos. São citados bancos de germoplasma institucionais na Coreia (*Allium sativum*, *A. aggregatum*, *A. macrostemon*), República Tcheca (*A. sativum*), Estados Unidos (*Citrus* spp., *Fortunella* spp., *Fragaria* spp., *Microcitrus australasica*, *Musa* spp., *Poncirus trifoliata*), Nigéria (*Dioscorea* spp. *Manihot esculenta*, *Petunia hybrida*), Finlândia (*Fragaria* spp.), China (*Helianthus tuberosus*, *Ipomoea batatas*, *Lilium* spp., *Musa* spp., *Petunia hybrida*), Colômbia (*Manihot esculenta*), Bélgica (*Musa* spp.). Segundo Wang *et al.* (2021), o método de vitrificação em gotículas é atualmente o método mais utilizado para criopreservar germoplasma vegetal em bancos e tem sido usado para criopreservar tanto espécies lenhosas como herbáceas.

Abaixo seguem alguns protocolos mais detalhados utilizados para a criopreservação de pontas de ramos encontrados nos artigos científicos publicados no período 2018-2022.

#### **4.3.9.1 Encapsulamento-desidratação**

Pontas de ramos *Chrysanthemum x grandiflorum* (2 mm de comprimento, contendo dois primórdios foliares e duas folhas jovens) foram criopreservadas por Kulus *et al.* (2019), através do método de encapsulamento-desidratação, como indica a Tabela 1. Os explantes foram mantidos por duas semanas em meio de cultura contendo 0,09 M de sacarose e 10  $\mu$ M de ácido abscísico, encapsulados em alginato de cálcio 3%. As cápsulas foram, expostas, por 4 dias à desidratação osmótica, em gradiente crescente de sacarose variando de 0,25 a 1 M, seguida de 3 h de dessecação ao ar livre, sob jato de ar esterilizado, o que reduziu para 40% a massa fresca do explante em relação à massa fresca inicial e depois foram transferidas para o nitrogênio líquido, submetidas ao descongelamento e transferidas para o meio de cultura. Nesse protocolo o pré-tratamento em sacarose, por duas semanas teve um efeito indutor de desidratação pela sacarose e a aplicação de ABA pode ter tido o efeito de também promover o acúmulo de solutos e/ou induzir a proteção à desidratação mais intensa, quando as cápsulas foram expostas à desidratação em soluções mais concentradas de sacarose e em seguida à desidratação sob jato de ar estéril.

No periódico Cryoletters, o artigo citado na Tabela 2 relata que o método de encapsulamento-desidratação que foi utilizado para criopreservar pontas de ramos de *Lamprocapnos spectabilis* (Kulus 2021). Esse método foi o menos frequente entre os protocolos de criopreservação de pontas de ramos. Bettoni *et al.* (2021) relatam que no método de encapsulamento-desidratação a água é removida das pontas de ramos por desidratação osmótica e física e os explantes são encapsulados em alginato para garantir um processo gradual e controlado da desidratação. De acordo com esses autores esse método pode ser combinado com a vitrificação, é o protocolo de encapsulamento-vitrificação, em que as pontas de ramos encapsuladas em alginato são desidratadas através da solução de vitrificação PVS2 ou PVS3.

#### **4.3.9.2 Vitrificação**

Pontas de ramos adventícios (1,5 – 2 mm com 2-3 primórdios foliares), originados a partir de gemas axilares de *Chrysanthemum morifolium* foram

criopreservados por Su *et al.* (2022) através da vitrificação clássica, como indicado na Tabela 1. Grupos de ramos adventícios originados de gemas axilares foram mantidos a 4°C em refrigerador por 0-7 dias, em seguida foram pré-cultivados em meio MS com 0,4 M sacarose por 3 dias, imersos em solução de carregamento (MS contendo 0,4 M de sacarose e 2 M glicerol, por 20 min a 0°C, desidratados com PVS2 a 0°C, por 1 hora e imersão em nitrogênio líquido, por pelo menos 1 h. Em seguida foram reaquecidos em banho maria a 39°C por 2 min, imersos em meio MS contendo 1,2 M de sacarose, por 20 min em temperatura ambiente.

No periódico Cryoletters o método de vitrificação foi utilizado para criopreservar pontas de ramos de *Valeriana jatamansi* (SHARMA *et al.* 2021), *Dioscorea prazeri* (também pelo método de encapsulamento-vitrificação (THANKAPPAN E MORAWALA-PATEL 2020), *Cleome spinosa* (VILARDO *et al.* 2019) e *Mentha spp.* (SENULA *et al.* 2018), artigos citados na Tabela 2.

#### **4.3.9.3 Vitrificação em gotículas de pontas de ramos sobre tiras de papel alumínio**

O'Brien *et al.* (2021), artigo indicado na Tabela 1, criopreservaram pontas de ramos apicais de *Persea americana* (1,5 x 1,5 mm contendo 2 primórdios foliares intactos e a gema apical), através do método de vitrificação em gotículas sobre papel alumínio. Os explantes foram transferidos para uma solução de carregamento, contendo 2 M glicerol e 4 M sacarose por 20 minutos, em temperatura ambiente e em seguida, a solução foi substituída por solução a 0°C de crioprotetores PVS2 (30% glicerol, 15% DMSO, 15% etileno glicol e 0,4 M de sacarose ou solução VSL (20% glicerol, 10 % DMSO, 30% etileno glicol, 5% sacarose e 10 mM de cloreto de cálcio), nas quais permaneceram por períodos de incubação variando de 0 a 40 minutos. Em seguida, 5 min antes de expirar o tempo de incubação) as pontas de ramos foram removidas e colocadas sobre tiras de papel alumínio (0,8 cm de largura x 3 cm de comprimento, esterilizadas e resfriadas), em gotas contendo as soluções de PVS2 ou de VSL. Essas tiras foram colocadas em placas de Petri, mantidas em baixa temperatura, sobre gelo e em seguida transferidas para criotubos de 1,8 ml pré-resfriados em NL, que foram então imersos no nitrogênio líquido. Após 30 minutos, as pontas de ramos foram removidas,

imersas por 20 min na solução de descarregamento, descongelamento lento, em temperatura ambiente, para eliminar resquícios das soluções de crioprotetores e inoculadas em meio de cultura.

Nesse protocolo, portanto, os explantes não foram encapsulados e observa-se no artigo científico que foram inicialmente mantidos na solução contendo glicerol e sacarose, que teve a função de induzir uma desidratação osmótica e osmoproteção, antes da exposição às soluções de vitrificação. A vitrificação em gotículas foi utilizada para criopreservar *Actinidia chinensis* var. *chinensis* (MATHEW *et al.* 2019); *Actinidia* spp. (PATHIRANA *et al.* 2021)), *Ipomoea batata* (VOLLMER *et al.* 2019), *Allium cepa* var. *aggregatum* (WANG *et al.* 2020; WANG *et al.* 2021), *Cirsium hillii* (BI *et al.* 2021) ameaçada de extinção, *Ribes nigrum* (RANTALA *et al.* 2021), *Physalis angulata* (ROMO-PAZ *et al.* 2021), *Gentiana kurroo* (SHARMA *et al.* 2021), artigos indicados na Tabela 1.

Pontas de ramos de *Dracocephalum austriacum* ameaçada de extinção foram criopreservadas através do método de vitrificação em gotículas (RAS *et al.* 2020), artigo citado na Tabela 1. As pontas de ramos foram cultivadas em meio MS contendo 0,3 M de sacarose a 25°C em placas de petri por 16-19 horas, após o que foram transferidas por solução de carregamento contendo 2 M glicerol e 0,4 M sacarose, por 20 min. Em seguida os explantes foram imersos em 3 ml de solução PVS3 (50% sacarose, 50% glicerol) por 2 h e transferidos para gotas de 4 µl de solução PVS3, colocadas sobre tiras de papel alumínio esterilizadas. Em seguida, as tiras contendo os explantes foram colocadas em criotubos que foram fechados e colocados no nitrogênio líquido, por 1 hora. Após esse período os criotubos foram descongelados em banho maria a 40°C, por aproximadamente 30 segundos, as tiras foram removidas e as pontas de ramos lavadas com 6 ml de solução 1,2 M de sacarose por 20 min, em temperatura ambiente e transferidas para o meio de cultura. Nesse protocolo observa-se que a solução PVS3 contendo apenas sacarose e glicerol foi utilizada, pois muitos materiais vegetais são sensíveis a alguns componentes da solução PVS2 como o etileno glicol e o DMSO.

Delgado-Aceves *et al.* (2022), artigo indicado na Tabela 1, criopreservaram pontas de ramos de *Agave peacockii*, contendo um domo meristemático com um primórdio foliar (1 mm de comprimento x 1 mm de largura). As pontas de ramos foram transferidas para meio de cultura contendo 0,3 M de sacarose por 3 h, em seguida

tratados com uma solução de carregamento com 0,4 M de sacarose e 1,6 M de glicerol por 20 min. Em seguida as pontas de ramos foram imersas na solução de PVS2, para desidratação osmótica, por 15 minutos e transferidas para as gotículas de PVS2 depositadas sobre as tiras de papel alumínio de 0,5 x 2 cm, que foram colocadas nos criotubos de 2 ml contendo nitrogênio líquido. Os criotubos permaneceram em nitrogênio líquido por 30 min, em seguida as tiras de papel alumínio foram removidas e imersas em solução contendo 1,2 M de sacarose, por 20 min e inoculadas em meio de cultura. Nesse protocolo de vitrificação em gotículas, novamente foi utilizada a osmoproteção na solução de carregamento contendo sacarose e glicerol, seguida da desidratação osmótica e vitrificação na solução de PVS2.

No periódico Cryoletters o método de vitrificação em gotículas foi utilizado para criopreservar várias espécies importantes como *Pogostemon yatabeanus*, espécie aquática ameaçada de extinção (LEE *et al.* 2021), *Quercus* sp. (PENSE E CHAIKEN 2020), *Vitis* sp. *Vitis aestivalis*, *Vitis Jacquemontii* (BETTONI *et al.* 2019), VOLK *et al.* 2018), *Aster altaicus var. uchiyamae kitam* (CHOI *et al.* 2019), *Tussilago farfara* (HAMBECK *et al.* 2019) e *Artemisia laciniata* (KODYM *et al.* 2018), artigos mencionados na Tabela 2.

#### 4.3.9.4 Encapsulamento–vitrificação

Pontas de ramos de *Lamprocapnos spectabilis* foram criopreservadas por Kulus e Tymoszuk (2021), artigo citado na Tabela 1, através do método de encapsulamento-vitrificação. As pontas de ramos foram mantidas em solução de alginato de sódio a 3% contendo 9% de sacarose e as cápsulas foram produzidas após a imersão em  $\text{CaCl}_2$  0,1 M, por 30 min. As cápsulas foram imersas em solução 2 M de glicerol e 0,4 M de sacarose por 20 min, procedimento de osmoproteção. Em seguida os explantes foram desidratados na solução de vitrificação PVS3 (50% glicerol e 50% sacarose) por 150 min., após o que as cápsulas de alginato foram transferidas para os criotubos, imersas em PVS3 e transferidas para o nitrogênio líquido, de um dia para o outro, e em seguida removidas, transferidas para banho maria a 40°C (descongelamento rápido), por 3 min e em seguida inoculadas em meio de cultura. Nesse protocolo verifica-se que os explantes

foram encapsulados em alginato de sódio contendo 9% de sacarose, o que contribuiu para induzir algum nível de desidratação osmótica, assim como o procedimento de osmoproteção e de desidratação adicional na solução de vitrificação. Esse método também foi mencionado na revisão sobre criopreservação de árvores de importância medicinal (ARORA *et al.* 2022).

#### **4.3.9.5 V-crioplaca (Desidratação em crio-placas em solução de vitrificação)**

Pontas de ramos de *Hovenia dulcis* foram criopreservadas através do método de vitrificação em crioplacas (V crioplaca) (SAAVEDRA *et al.* 2021). Segmentos apicais (1-2 cm de comprimento) passaram por pré-tratamento em meio de cultura contendo 0.3 M de sacarose por 24 horas. Em seguida foram colocados nos compartimentos da crioplaca de alumínio, cobertos com uma gota de 2 µl de meio de cultura suplementado com alginato de sódio de baixa viscosidade a 3% e 0,09 M e sacarose. O meio contendo o alginato de sódio foi polimerizado pela adição da solução de cloreto de cálcio na superfície da crio-placa. Depois de 15 min em temperatura ambiente, após a completa polimerização do alginato, a solução de cloreto de cálcio foi removida da crioplaca.

As pontas de ramos aderidas à crio-placa foram tratadas por 20 min em temperatura ambiente, com a solução de carregamento, para a osmoproteção, contendo meio MS suplementado com 2 M de glicerol e 0,4 M de sacarose e em seguida imersas na solução de vitrificação PVS2 (30% glicerol, 15% DMSO, 15% etileno glicol e 0,4 M de sacarose em meio MS, onde permaneceram por períodos de 0 a 150 min. Em seguida a crioplaca foi transferida para o criotubo sem tampa, de 2 ml, contendo nitrogênio líquido e o criotubo mantido no nitrogênio líquido. Após 15 min as crio-placas foram transferidas para a solução de descarregamento contendo meio MS e 1,2 M de sacarose, em temperatura ambiente (descongelamento lento), por 15 min, sendo então as pontas de ramos removidas e transferidas para o meio de cultura. Esse método foi utilizado também a criopreservação de pontas de ramos de *Passiflora suberosa*.

Na Cryoletters o método V-crio-placa foi utilizado para criopreservar pontas de ramos de *Vitis aestivalis*, *Vitis jacquemontii* (BETTONI *et al.* 2019) e de *Cleome spinosa* (VILARDO *et al.* 2019), artigos indicados na Tabela 2.

#### 4.3.9.6 D-crioplaca (Desidratação em crioplacas no fluxo laminar)

Esse método foi adotado em apenas um artigo científico do periódico PCTOC e não foi utilizado em nenhum dos artigos da Cryoletters.

Tanaka *et al.* (2021) cripeservaram pontas de ramos de *Allium sativum* através do método de desidratação em crio-placas, no fluxo laminar (D crioplaca). Pontas de ramos (2 cm de comprimento) foram pré-cultivadas em meio de cultura contendo 0.3 M de sacarose por dias a 25°C e em seguida transferidas para os compartimentos (2,5 mm de diâmetro) de crio-placas de alumínio (37 mm x 7 mm). Em cada compartimento foi adicionada uma gota de solução de 3% de alginato e 0,4 M de sacarose e em seguida gotas de solução de cloreto de cálcio a 0,1 M foram colocadas na superfície das crioplacas, para polimerização do alginato. Após 15 min a solução de cloreto de cálcio foi removida e as pontas de ramos encapsuladas no alginato na crio-placa foram tratadas com a solução 0,04 ou 1 M de sacarose e 0, 1 ou 2 M glicerol em meio de cultura MS, por 30 min a 25°C, para a osmoproteção. Em seguida as crioplacas foram removidas da solução de carregamento, submetidas à desidratação ao ar livre, no fluxo laminar por 0 a 240 min e transferidas para criotubos de 2 ml, com tampa para freezer a -80°C ou sem tampa, para o nitrogênio líquido, por 60 min ou no deep freezer a -80°C, por 14 dias. Em seguida, as crioplacas foram removidas e mergulhada numa placa de Petri contendo meio de cultura suplementado com 1 M de sacarose, a 25 °C, por 30 min (descongelamento lento), após o que as pontas de ramos foram removidas das crioplacas e transferidas para meio de cultura. O tempo ótimo de desidratação das pontas de ramo no fluxo laminar foi de 30 a 180 min.

Nesse protocolo foi realizada a osmoproteção das pontas de ramos seguida da desidratação das crio-placas contendo as pontas de ramos, ao ar livre, no fluxo laminar, sem haver a necessidade da utilização da solução de vitrificação.

#### 4.3.10 Culturas embriogênicas

No periódico Cryoletters não foram encontrados artigos sobre criopreservação de culturas embriogênicas no período (2018-2022). Os trabalhos relatados a seguir foram encontrados apenas no periódico PCTOC citados na Tabela 1.

Quatorze linhagens de culturas embriogênicas de *Pinus radiata* foram criopreservadas por Lineros *et al.* (2018) através do pré-tratamento com 0,4 M de sorbitol, por 48 horas mantidas em agitador orbital a 80 rpm e a 22°C e transferidas para tratamentos crioprotetores, contendo soluções com concentrações de 5% e 10% de DMSO e 0,09M de prolina. Alíquotas de 1 ml da suspensão foram colocadas em criotubos de 2 ml, mantidas em freezer a -80 °C por 120 min e depois imersas em nitrogênio líquido por 2-4 semanas. Após esse período as amostradas criopreservadas foram transferidas para banho maria a 37 °C por 1-2 min. Os criotubos com as amostras foram desinfetados após imersão em etanol 70%, o conteúdo removido em papel filtro, no fluxo laminar e os tecidos embriogênicos transferidos para uma placa de Petri contendo o meio de cultura de multiplicação. Os tratamentos crioprotetores com DMSO foram eficientes para garantir ao redor de 60% de recuperação e a concentração de 5% de DMSO foi mais eficiente.

Culturas celulares embriogênicas de espécies ornamentais de *Sterwattia* spp. foram criopreservadas (GLADFELTER *et al.* 2021) através da pré-cultura de tecidos embriogênicos em meio de cultura líquido WPM, contendo reguladores de crescimento. Após uma semana foram transferidos para frascos contendo 20 ml do mesmo meio contendo 0,4 M de sorbitol, onde permaneceram de um dia para o outro e a seguir mantidos a 4°C, por 30 min e depois transferidos para criotubos. O meio de cultura com sorbitol foi substituído por 20 ml de meio de cultura contendo 0,4 M de sorbitol e 10% de DMSO. As células foram misturadas na solução de DMSO e sorbitol e em seguida 1,8 ml da suspensão foi transferida para criotubos de 2 ml, que foram colocados a 1°C, no container de congelamento e transferido para freezer a -80 °C, onde permaneceram de um dia para o outro, quando os criotubos foram imersos em nitrogênio líquido. Após um ano os criotubos foram removidos para -80°C, por 1 hora e meia e depois colocados em banho maria a 40°C, por 2 min (descongelamento rápido). Os agregados embriogênicos foram removidos da solução do DMSO sobre papel filtro, no fluxo laminar e transferidos para o meio de cultura.

Tecidos embriogênicos originados a partir de sementes imaturas de *Pinus koraiensis* foram criopreservados (Peng *et al.* 2021), através da cultura sobre papel filtro, por 7 dias seguida da suspensão em meio líquido suplementado com concentrações de sorbitol variando de 0,2 a 0,8 M de sorbitol por períodos de 9 a 36 h a 25°C. Em seguida a suspensão foi colocada sobre gelo e o DMSO foi adicionado em concentrações variando de 5 a 12,5%, para garantir a crioproteção. Após 1,5 h os tecidos embriogênicos foram transferidos para os criotubos resuspensos em 1,8 ml de meio de cultura e transferidos para freezer a -80°C, até a temperatura do criotubo atingir -80°C, quando então foram imersos em nitrogênio líquido. Após 24 h foram transferidos para banho maria a 37°C (descongelamento rápido) e para o meio de cultura. O DMSO é um crioprotetor muito utilizado, mas é tóxico e pode causar alterações genéticas epigenéticas nas células, portanto tem que ser usado na mínima concentração que possibilita a crioproteção e a menor toxicidade aos tecidos. As melhores concentrações de 0,4 M de sorbitol e de 10% DMSO garantiram a maior sobrevivência dos tecidos embriogênicos.

Culturas embriogênicas de *Bactris gasipaes* foram criopreservadas pelo método de vitrificação em gotículas sobre tiras de papel alumínio (REE E GUERRA 2021) em que as culturas foram transferidas para o meio líquido MS suplementado com 0,3 M de sacarose por 1 h, imersas em meio contendo 0,6 M de sacarose por 1h e transferidas para a solução de vitrificação PVS3, por períodos de 60 a 240min. Em seguida, gotículas de solução de PVS3 foram colocadas sobre tiras de papel alumínio e em cada gota foram colocadas culturas embriogênicas. As tiras foram imersas em nitrogênio líquido por 1 min, após o que foram colocadas em 1,5 ml criotubos, que foram transferidos para o nitrogênio líquido novamente. Após a incubação em nitrogênio líquido, os criotubos foram removidos, imersos em banho maria a 45°C, por 2 min e incubados em meio de cultura MS contendo 1,2 M de sacarose, para descarregamento e posterior inoculação em meio de cultura. A vitrificação em gotículas por 60 min na solução PVS3 foi a mais eficiente.

Observa-se que os três primeiros protocolos de criopreservação de culturas embriogênicas utilizaram o sorbitol como pré-tratamento, para induzir a desidratação osmótica, seguido da utilização do DMSO como crioprotetor e transferência para freezer -80°C antes da imersão no nitrogênio líquido, protocolos mais simples do que o utilizado para *Bactris gasipaes*, em que a sacarose é utilizada como pré-tratamento, não

foi utilizado o DMSO, mas sim a solução de vitrificação em gotículas sobre tiras de papel alumínio.

#### **4.3.11 Suspensões celulares**

No periódico Cryoletters não foram encontrados artigos sobre criopreservação de suspensões celulares no período (2018-2022). O trabalho relatado a seguir foi publicado no periódico PCTOC e é indicado na Tabela 1.

Suspensões celulares de *Polyscias filicifolia*, planta medicinal com atividade anti-inflamatória, foram criopreservadas Titova *et al.* (2021), pelo método do congelamento controlado em freezer programável, em que as células foram coletadas, imersas em uma solução contendo 15% de glicerol e 10% de sacarose. A solução de crioproteção contendo as células transferida para tubos de plástico de 0,5 ml, que foram colocados em um freezer programável a  $-7^{\circ}\text{C}$  por 20 min. Em seguida foi induzida a cristalização da solução e em seguida os tubos foram resfriados em taxa de  $0,4\text{C}/\text{min}$  para  $-35^{\circ}\text{C}$  e transferidos para o nitrogênio líquido. Após 5 anos, os tubos foram removidos do nitrogênio líquido e reaquecidos a  $20^{\circ}\text{C}$  e as células transferidas para o meio de cultura.

Nesse caso, foi utilizado o freezer programável para induzir a desidratação das células, através do abaixamento lento e programado da temperatura. Esse método é muito eficiente e aplicado quando os outros métodos de criopreservação não funcionam devido ao alto teor de água das células. No periódico Cryoletters não foram encontrados artigos sobre criopreservação de culturas embriogênicas no período (2018-2022).

#### **4.3.12 Calos**

Calos de *Picea abies*, utilizados para desenvolver suspensões celulares que produzem lignina foram criopreservados através da técnica de vitrificação por Viljamaa *et al.* (2018), artigo citado na Tabela 1. Os calos foram pré-cultivados por 24 h em

meio de cultura contendo 0,2 M de sacarose e outras 24 h em meio contendo 0,4 M de sacarose para induzir a desidratação. Em seguida pedaços de calos foram transferidos para os criotubos contendo solução de carregamento (2 M de glicerol e 0,4 M de sacarose), mantidos em temperatura ambiente por 20-25 min e transferidos para a solução de PVS2 contendo 30% de glicerol, 15% etileno glicol, 15% de DMSO e 0,4 M de sacarose, sobre gelo. Após 60 foram transferidos para o nitrogênio líquido por pelo menos 1 h. Em seguida os criotubos foram removidos e imersos em banho maria a 38°C, por 1,5 min, a a solução de PVS2 foi removida e os pedaços de calos transferidos para o meio de cultura, após passarem por soluções sucessivas de descarregamento, contendo 1,2 M; 0,4 M e 0,2 M de sacarose.

Na revisão publicada por Arora *et al.* (2022) sobre árvores medicinais os autores ressaltam a importância crescente da conservação *in vitro* de várias espécies nas últimas duas décadas, salientando que nos últimos anos tem havido progresso nas aplicações de técnicas de cultura de tecidos na conservação desses recursos genéticos, importantes pela produção de metabólitos secundários de importância medicinal. Os autores apontam que entre 2005 e 2021 foram criopreservadas várias espécies utilizando-se diferentes tipos de materiais vegetais e de protocolos de criopreservação. Entre essas espécies são citadas a *Aesculus hippocastanum* (calos embriogênicos, vitrificação), *Crateva nurvala* (pontas de ramos axilares, vitrificação), *Hancornia speciosa* (pontas de ramos, vitrificação e vitrificação em gotículas), *Hovenia dulcis* (pontas de ramos, V crio-placa), *Lepisanthes fruticosa* (eixo embrionário, vitrificação e encapsulamento-vitrificação), *Melia azedarach* (limonoide, pontas de meristemas, encapsulamento-desidratação; embriões somáticos (encapsulamento-desidratação), *Mimusops elengi* (eixo embrionários, dessecação de sementes e criopreservação), *Nothapodytes nimmoniana* (camptotecina, eixo embrionário com cotilédones (desidratação ao ar livre), *Parkia speciosa* (pontas de ramos, encapsulamento-vitrificação; eixo de embriões zigóticos, dessecação ou vitrificação). É importante observar que pontas de ramos, calos embriogênicos, eixos de embriões zigótico e embriões somáticos foram os principais materiais vegetais criopreservados, sendo muitos deles originados através das culturas *in vitro* dessas espécies.

#### 4.4 ANÁLISE MÉTRICA DOS ARTIGOS CIENTÍFICOS PUBLICADOS NA PCTOC E CRYOLETTERS NO PERÍODO 2018-2022

Observa-se pela Tabela 3 que foram publicados no total 46 artigos científicos na PCTOC, sendo que o pico da produção foi em 2021, com 26 trabalhos publicados sendo 5 deles revisões. As 5 revisões foram publicadas em 2021 e uma em 2022 e abordaram os seguintes temas: Tecnologias de criopreservação de pontas de ramos (BETTONI, BONNART, VOLK 2021), criopreservação e bancos de germoplasma *in vitro* (OCHATT *et al.* 2021), criopreservação de raízes e bancos de germoplasma *in vitro* (POPOVA *et al.* 2021), criopreservação em larga escala de gemas dormentes de plantas lenhosas (TANNER *et al.* 2021), criopreservação em propágulos derivados de culturas *in vitro* (WANG *et al.* 2021) e criopreservação de espécies de árvores medicinais (ARORA *et al.* 2022). É importante notar que apenas é possível publicar revisões quando já se dispõe de volume considerável de informações sobre o tema e a publicação das revisões em questão indicam a disponibilidade considerável número de artigos científicos sobre os tópicos abordados.

Na Cryolletters foi publicado um número menor de artigos no período analisado (31) e o pico da produção ocorreu em 2019-2020. Entre os 31 artigos publicados foram encontradas duas revisões: uma revisão de Benson *et al.* (2018,) sobre a importância da tecnologia do encapsulamento em alginato para aprimorar a conservação *in vitro* de propágulos vegetais, tanto na criopreservação como no armazenamento de germoplasma sem congelamento e uma revisão de Dinato *et al.* (2020) sobre a criopreservação para melhoramento genético de plantas e conservação de recursos genéticos.

Tabela 3. Número de artigos científicos sobre criopreservação de plantas publicados por ano nos periódicos Plant Cell Tissue and Organ Culture e Cryoletters no período 2018-2022.

<b>Ano</b>	<b>PCTOC</b>	<b>Cryoletters</b>	<b>Total</b>
2018	5	7	12
2019	7	10	17
2020	3	8	11
2021	26	5	31
2022	5	1	6
<b>Total</b>	<b>46</b>	<b>31</b>	<b>77</b>

Os dados da Tabela 4 indicam a quantidade de artigos publicados por país nos periódicos PCTOC e Cryoletters e mostram que na PCTOC o país que liderou as publicações foi a China (12 publicações), seguida dos EUA (5), Brasil (4) e Índia (3). Na Cryoletters a Índia liderou as publicações (5), seguida dos EUA (4) e Brasil (4). Observa-se que o total de trabalhos publicados em ambos os periódicos no período 2018-2022 a China liderou com 13 publicações, seguida de EUA (9), Índia (8) e Brasil (8), indicando que o Brasil está entre os países que ocupam o segundo lugar depois da China. Esses resultados indicam a relevância dos resultados do Brasil na área de criopreservação de plantas.

Tabela 4. Número total de artigos científicos publicados por país nos periódicos Plant Cell Tissue and Organ Culture e Cryoletters no período 2018-2022.

<b>País</b>	<b>PCTOC</b>	<b>Cryoletters</b>	<b>Total</b>
Alemanha	0	2	2
Argentina	1	0	1
Africa do Sul	0	2	2
Áustria	1	1	2
Austrália	1	0	1
Brasil	4	4	8
Canadá	1	0	1
Chile	1	0	1
Cuba	0	2	2
China	12	1	13
Coréia	1	1	1
Dinamarca	0	1	1
Espanha	1	1	2
EUA	5	4	9
Finlândia	2	1	3
França	1	1	2
Índia	3	5	8
Japão	1	1	2
México	2	0	2
Noruega	1	0	1
Nova Zelândia	2	1	3

Peru	1	0	1
Polônia	2	1	3
República Tcheca	1	0	1
Rússia	1	0	1
Tailândia	0	2	2
Turquia	1	0	1

Os dados da Tabela 5 mostram os números de artigos publicados, para cada tipo de utilização da espécie estudada, indicam que no periódico PCTOC as espécies de importância alimentar lideraram seguidas pelas espécies ornamentais. Já na Cryoletters as espécies medicinais, seguidas das alimentícias e ameaçadas de extinção foram as mais estudadas.

Na PCTOC, entre as espécies estudadas 6 artigos foram sobre as que estão ameaçadas de extinção: *Dracocephalum austriacum* (Áustria), *Cirsium hilli* (Canadá), *Gentiana kurroo* (Índia), *Pinus koraiensis* (China), *Polyscias filicifolia* (Rússia), *Agave peacockii* (México). Na Cryoletters os artigos sobre espécies ameaçadas de extinção (8) abordaram as seguintes espécies: *Pogostemon yatabeanus* (Coreia), *Valeriana jatamansi* (Índia), *Citrus cavaleriei* (Índia), *Syzygium maire* (Nova Zelândia), *Aquilaria malaccensis* (Índia), *Aster altaicus* (Rússia), *Vanilla siamensis* (Tailândia), *Artemisia laciniata* (Áustria). Predominaram entre as espécies importantes na alimentação as frutíferas e as produtoras de rizomas, tubérculos e bulbos e entre as espécies ornamentais de importância econômica predominando os estudos sobre os gêneros *Paeonia*, *Dendrobium*, *Chrysanthemum*, *Catleya* (Brasil), *Sterwartia*.

As espécies florestais estudadas em ambos os periódicos foram gimnospermas dos gêneros *Pinus*, *Picea*, além de *Bactris gasipaes* (Brasil), *Phoenix dactylifera* (Brasil) (PCTOC) e *Calophyllum antillanum*, *Borassus flabellifer*, *Quercus* sp., *Syzygium maire*, *Aquilaria malaccensis* e *Elaeis guineensis* (Cryoletters).

Entre as espécies de importância medicinal predominaram os estudos sobre *Passiflora suberosa* (Brasil), *Sterwartia* spp. *Hovenia dulcis* (Brasil), *Gentiana kurroo*, *Polyscias filicifolia*, além de uma revisão sobre as árvores de importância medicinal (PCTOC) e sobre *Calophyllum antillanum*, *Cannabis sativa*, *Valeriana jatamansi*, *Lamprocapnos spectabilis*, *Albemoschus moschatus*, *Clitoria ternatea*, *Cleome spinosa* (Brasil), *Tussilago farfara*, *Artemisia laciniata*, *Mentha* spp.

Entre as espécies de importância alimentar foram estudadas *Citrus cavaleriei*, *Dioscorea prazeri*, *Terammus labialis*, *Vitis aestivalis* (Brasil), *Vitis Jacquemontii* (Brasil), *Vanilla siamensis*, *Ipomoea batatas*, *Elaeis guineensis* (Brasil), *Malus x doméstica*, *Vitis* sp. *Zea mays*.

Tabela 5. Número de espécies estudadas, de acordo com a característica, nos artigos publicados nos periódicos Plant Cell Tissue and Organ Culture e Cryoletters no período 2018-2022.

<b>Característica</b>	<b>PCTOC</b>	<b>Cryoletters</b>	<b>Total</b>
Ornamental	10	3	13
Medicinal	6	10	16
Alimentícia	17	8	25
Florestal	3	5	8
Forrageiras	1	1	2
Fibras	0	1	1
Ameaçadas de extinção	5	9	14

Quando se considera os tipos de materiais vegetais utilizados para a criopreservação observa-se na Tabela 6 que em ambos os periódicos o maior número de artigos utilizou as pontas de ramos como explante, nos periódicos PCTOC (18 artigos) e na Cryoletters (12 artigos) no período 2018-2022, seguido dos artigos que utilizaram gemas (apicais, axilares, adventícias). Em menor número aparecem os artigos que utilizaram pólen, sementes, embriões zigóticos e somáticos, culturas embriogênicas, suspensões celulares e calos.

Tabela 6. Número de artigos dos diferentes tipos de materiais vegetais criopreservados que foram estudados e publicados nos periódicos Plant Cell Tissue and Organ Culture e Cryoletters no período 2018-2022.

<b>Tipos de materiais vegetais</b>	<b>PCTOC</b>	<b>Cryoletters</b>	<b>Total</b>
Pólen	3	3	6
Sementes	2	5	7
Embriões zigóticos	1	4	5
Embriões somáticos	0	1	1

Protocórmios	2	1	3
Gemas	6	5	11
Meristemas	1	0	1
Pontas de ramos	18	12	12
Culturas embriogênicas	4	0	4
Suspensões celulares	1	0	1
Calos	1	0	1

A análise da Tabela 7 mostra os tipos de métodos utilizados na criopreservação nos artigos publicados nos periódicos PCTOC e Cryoletters no período 2018-2022. Verifica-se que em ambos os periódicos o protocolo mais utilizado foi o da vitrificação em gotículas sendo 18 artigos do PCTOC e em 9 artigos da Cryoletters, seguidos dos métodos de vitrificação clássica, descrito em 9 e 8 artigos, respectivamente. Aqui é importante ressaltar que os métodos utilizados variaram muito com o tipo de explante.

Tabela 7. Número de artigos científicos por tipo de método utilizado na criopreservação de plantas publicados nos periódicos Plant Cell Tissue and Organ Culture e Cryoletters no período 2018-2022.

<b>Tipos de métodos</b>	<b>PCTOC</b>	<b>Cryoletters</b>	<b>Total</b>
Imersão direta em nitrogênio líquido	5	6	11
Desidratação	3	7	10
Vitrificação	9	8	17
Vitrificação de gotículas	18	9	27
Encapsulamento-desidratação	4	5	9
Encapsulamento-vitrificação	2	2	4
V-crioplaca	3	3	6
D-crioplaca	1	0	1
Freezer programável	2	0	2
Crioprotetores a -80°C	3	0	3

#### **4.5 ARTIGOS CIENTÍFICOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS CADASTRADOS NA SCIELO NO PERÍODO 2018-2022**

A Tabela 8 mostra a lista de artigos científicos encontrados no período 2018-2022 na Scielo, as instituições onde os trabalhos foram desenvolvidos, a espécie, o material vegetal utilizado e as referências. Foram publicados em periódicos nacionais 16 artigos científicos.

Os trabalhos foram desenvolvidos nas Universidades Federais e em Institutos de Pesquisa como EMBRAPA, CENA/ESALQ/USP (Centro Nacional de Energia Nuclear) e IETEC (Instituto de Educação Tecnológica de Minas Gerais). As universidades federais envolvidas estão localizadas em diferentes estados do nordeste, centro-oeste, sudeste e sul.

Dos 15 artigos publicados observa-se que foram estudadas espécies de valor econômico como *Eucalyptus grandis*, *Coffea arabica*, *Phaseolus lunatus*, *Musa accuminata* e *Nicotiana tabacum*, mas destacam-se também várias espécies nativas do Brasil *Hevea brasiliensis*, *Butia yatay*, *Astronium urundeuva*, *Pyrostegia venusta* e *Vriesea reitzii*, *Cattleya labiata*, *Encyclia cordigera*, *Epidendrum ciliare* algumas delas ameaçadas de extinção.

Entre os 15 artigos predominaram os realizados com sementes (9) e embriões zigóticos (4) seguidos de pontas de ramos (1) e rizomas (1). Entre os métodos utilizados na criopreservação predominaram os métodos de vitrificação (8 artigos), seguida da desidratação (7) e imersão direta (1), isso pelo fato de ter predominado a utilização de sementes e embriões zigóticos.

Tabela 8. Alguns artigos científicos produzidos no Brasil publicados em periódicos da plataforma SCIELO no período 2018-2022.

Instituição	Espécie	Material vegetal	Método	Referência
Universidade Federal de Santa Catarina	<i>Vriesea reitzii</i>	Sementes	Imersão direta	Montoya-Serrano et al. (2022)
Universidade Federal de Lavras	<i>Eucalyptus grandis</i>	Pontas de ramos de plântulas germinadas <i>in vitro</i>	V-crio-placa	Rafaeli et al. (2022)
Universidade Estadual de Londrina	<i>Astronium urundeuva</i>	Sementes	Vitrificação	Paula et al. (2022)
Universidade Estadual de Ponta Grossa	<i>Hevea brasiliensis</i>	Embriões zigóticos	Vitrificação	Carvalho et al. (2021)
Universidade Federal de Lavras/EMBRAPA	<i>Coffea arabica</i> L.	Sementes	Desidratação Resfriamento	Figueiredo et al. (2021)
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia/EMBRAPA/CENA	<i>Vriesea bahiana</i> , <i>Hohenbergia castellanosii</i> , <i>Encholirium spectabile</i>	Sementes	Desidratação	Simone et al. (2021)
UNESP/Universidade Federal da Grande Dourados	<i>Encyclia cordigera</i> e <i>Epidendrum ciliare</i>	Sementes	Vitrificação	Pereira et al. (2021)
EMBRAPA/Universidade Federal de Pelotas	<i>Butia yatay</i>	Embriões zygóticos	Desidratação	Vargas et al. (2020)
EMBRAPA	<i>Pyrostegia venusta</i>	Sementes	Desidratação	Salomão et al. (2020)
Universidade Estadual de Londrina	<i>Cattleya labiata</i>	Sementes	Desidratação	Ferrari et al. (2020)
EMBRAPA/Universidade Federal de	<i>Cocos nucifera</i>	Embriões zigóticos (plúmulas)	Vitrificação	Lédo et al. (2020)

Sergipe				
Universidade Federal de Campina Grande/IETEC MG	<i>Phaseolus lunatus</i>	Sementes	Desidratação	Luciano et al. (2019)
Universidade Estadual de Londrina	<i>Epidendrum radicans</i> e <i>Arundina bambusifolia</i>	Sementes	Vitrificação	Paula et al. (2018)
EMBRAPA/Universidade Federal de Sergipe	<i>Cocos nucifera</i>	Embriões zigóticos	Vitrificação	Lédo et al. (2018)
EMBRAPA/Universidade Federal do Ceará	<i>Musa accuminata</i>	Rizomas produzidos <i>in vitro</i>	Vitrificação	Londe et al. (2018)

Na Tabela 9 são apresentadas as teses e dissertações realizadas no Brasil no período 2018-2022. Foram encontradas 21 teses/dissertações sobre criopreservação produzidas em várias universidades federais localizadas no sul, sudeste, centro-oeste e nordeste e as espécies estudadas, com raras exceções, foram as espécies brasileiras. Em 2019 diminuíram os estudos referentes ao assunto comparados com 2018, assim como no ano seguinte, mas em 2022 voltaram a ser desenvolvidos estudos referentes à criopreservação. Também é possível observar que em 2018 as instituições localizadas na região norte, nordeste e sudeste do Brasil intensificaram as pesquisas relacionadas à criopreservação comparados com outras regiões do país. Durante a pandemia, em 2020 houve uma queda brusca na produção de teses e dissertações, decorrente do isolamento e da restrição de recursos para a pesquisa.

Observa-se na Tabela 9 que as teses e dissertações desenvolvidas abordaram várias espécies nativas ornamentais, frutíferas e medicinais. A criopreservação de espécies frutíferas tropicais, como o jenipapo e o cacau podem ter implicações importantes para a agricultura e a segurança alimentar. A proteção dessas espécies em bancos de germoplasma, para posterior utilização em programas de melhoramento genético também é fundamental para desenvolver variedades com características agrônômicas importantes e auxiliar na produção de mudas de genótipos superiores selecionados.

O melhoramento genético, a propagação vegetativa e a conservação de porta-enxertos como o de *Prunus avium*, por exemplo, pode facilitar a produção de mudas de qualidade e o desenvolvimento de variedades resistentes a doenças e estresses ambientais. Estudos realizados por Guterres (2022) sobre a manipulação de fatores como a influência de diferentes espectros luminosos na recuperação de culturas criopreservadas de *Vriesea reitzii* e na germinação de sementes pode fornecer informações sobre os requisitos de cultivo dessas espécies e otimizar os métodos de conservação *in vitro* e de recuperação das plantas.

Além disso, a exploração farmacológica de plantas, a investigação de aspectos fitoquímicos e do potencial farmacológico, como no caso de *Passiflora pohlii*, *Bauhinia holophylla*, *Tabebuia roseoalba* e *Cybistax antisyphilitica* podem abrir caminhos para a descoberta de novos compostos bioativos e o desenvolvimento de novos medicamentos, havendo a necessidade de ampliar os estudos sobre criopreservação de culturas de células e suspensões celulares produtoras de compostos de importância medicinal.

Tabela 9. Teses e dissertações realizadas no período 2018-2022 em instituições brasileiras.

<b>Instituição</b>	<b>Autor</b>	<b>Espécie</b>
Universidade Estadual Paulista	Pereira (2022)	<i>Brassavola perrinii</i> <i>Encyclia cordigera</i> , <i>Epidendrum ciliare</i>
Universidade Federal de Santa Catarina	Guterres (2022)	<i>Vriesea reitzii</i>
Universidade Federal de Alfenas	Giovana (2019)	<i>Bowdichia Virgilioides</i>
Universidade do Estado do Rio de Janeiro	Simao (2019)	<i>Passiflora pohlii</i>
Universidade de Lavras	Lopes (2019)	<i>Nicotiana tabacum</i>
Universidade Federal de Santa Catarina	Ree (2019)	<i>Bactris gasipaes</i>
Universidade Federal de Lavras	Carvalho (2019)	<i>Eucalyptus grandis</i> , <i>Eucalyptus urophylla</i>
Universidade do Estado de Santa Catarina	Souza (2019).	<i>Malus prunifolia</i>
Universidade Federal de Sergipe	Nascimento (2018)	<i>Genipa americana</i>
Universidade Federal de Sergipe	Santana (2018)	<i>Cocoa nucifera</i> , <i>Hancornia speciosa</i>
Universidade Federal de Pelotas	Gerhardt (2018)	<i>Prunus avium</i>
Instituto federal de educação, ciência e tecnologia goiano	Cabral (2018)	<i>Sapindus saponaria</i> .
Universidade Federal de Recôncavo da Bahia	Silva (2018)	<i>Alcantarea nahoumii</i> , <i>Vriesea bahiana.</i> , <i>Hohenbergia castellanosi</i> , <i>Encholirium spectabile</i> .
Universidade do Estado do Mato grosso	Barros (2018)	<i>Microdendrum urundeuva</i> , <i>P. dubium</i> , <i>A. fraxinifolium</i> , <i>H. impetiginosus</i> .
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia	Santos (2018)	<i>Musa</i> spp.
Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro	Generoso (2018)	<i>Passiflora edulis</i>
Universidade Federal de São João Del-Rei.	Rezende (2018)	<i>Bauhinia holophylla</i>
Universidade Federal de Pelotas	Rosa (2018)	<i>Prunus</i> spp
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia/EMBRAPA	Silva (2018)	<i>Plassifora</i> spp.
Universidade Federal de Lavras	Souza (2018)	<i>Genipa americana</i> .
Universidade Federal de Lavras.	Morais (2018)	<i>Tabebuia roseoalba</i> , <i>Cybistax antisyphilitica</i>

## 5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A presente revisão mostrou que no período 2018-2022 as espécies medicinais, ornamentais, alimentícias e florestais foram estudadas, sendo várias delas ameaçadas de extinção. As pontas de ramos e a vitrificação em gotículas foram as estratégias mais frequentes utilizadas para a criopreservação detectadas nos artigos científicos. Isso porque as pontas de ramos são mais estáveis geneticamente e asseguram a fidelidade genética do material vegetal, quando o objetivo é a produção de mudas. A vitrificação em gotículas de pontas de ramos tem sido usada com sucesso para o estabelecimento de criobancos de várias espécies em diferentes partes do mundo (WANG *et al.*, 2021). Entretanto, outros tipos de materiais vegetais e métodos de criopreservação também foram utilizados com sucesso e variaram de acordo com o objetivo do trabalho.

Considerando o cenário internacional, apesar do levantamento bibliográfico no período 2018-2022 ter sido realizado em apenas dois periódicos internacionais e abrangendo o período da pandemia, foi possível constatar que a diversidade de países que elaboraram pesquisas sobre a criopreservação confirma o amplo interesse mundial por essa tecnologia, assim como os resultados positivos relatados nos diferentes artigos científicos, para as diversas espécies, confirmam a relevância da criopreservação como estratégia para a conservação *in vitro* de germoplasma vegetal. Uma outra constatação que confirma o potencial dessa tecnologia são as várias revisões recentes publicadas sobre a criopreservação de materiais vegetais específicos como pontas de ramos, raízes, grãos de pólen, gemas de plantas lenhosas além de revisões abordando a criopreservação de árvores medicinais e bancos de germoplasma *in vitro*. Em várias dessas revisões foram compilados tanto resultados promissores, conduzidos com dezenas de espécies vegetais como os desafios em implementar as tecnologias de criopreservação para certos tipos de materiais vegetais.

O interesse de cientistas brasileiros pela aplicação dessa tecnologia para a conservação *in vitro* também foi constatado com as publicações de artigos científicos, no período 2018-2022, em ambos os periódicos internacionais analisados, em número equivalente aos publicados pela Índia e EUA. Os artigos publicados em ambos os periódicos internacionais foram sobre *Passiflora suberosa* (VIANNA *et al.* 2019) em cooperação da Universidade Estadual do Rio de Janeiro com a França; *Phoenix dactilifera* (OLIVEIRA *et al.* 2021), em cooperação entre Universidade Federal de

Sergipe, Embrapa e EUA; a espécie medicinal *Hovenia dulcis* (SAAVEDRA *et al.* 2021), desenvolvido na Universidade Estadual do Rio de Janeiro; *Bactris gasipaes* nativa do Brasil, Ree e Guerra (2021) em cooperação da Universidade Federal de Santa Catarina com a Itália; *Vitis aestivalis e Vitis Jacquemontii* (BETTONI *et al.* 2019), em cooperação BR/EUA; a espécie medicinal *Cleome spinosa* (VILARDO *et al.* 2019, nativa do Brasil), *Catlleya sp* (FILETI *et al.* 2021, nativa do Brasil) e a revisão de perspectivas sobre a importância da criopreservação de pólen para a conservação de germoplasma e melhoramento genético (DINATO *et al.* 2020), desenvolvidos no Brasil. A colaboração internacional desempenha importante papel no intercâmbio das tecnologias de criopreservação desenvolvidas.

O número de publicações de autores brasileiros em periódicos nacionais no período de 2018-2022 superou o número das publicações nos periódicos internacionais. Outra constatação importante foi que a maioria das teses e dissertações sobre criopreservação e foram produzidas principalmente nas universidades federais localizadas no sul, sudeste, centro-oeste e nordeste, o que certamente está contribuindo para consolidar grupos de pesquisa atuantes na área. Esses grupos de pesquisa desempenharam até o momento um papel promissor na formação de recursos humanos e no desenvolvimento da tecnologia de criopreservação aplicada à conservação, como complementação dos métodos convencionais de conservação de germoplasma vegetal, que também devem ser estimulados.

É importante salientar que a colaboração internacional, a disponibilidade de recursos humanos treinados na área e a infraestrutura adequada são os requisitos necessários para a implementação das tecnologias de criopreservação e criobancos (BETTONI, BONNART, VOLK, 2021).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Arora, K., Rai, M.K. & Sharma, A.K. Tissue culture mediated biotechnological interventions in medicinal trees: recent progress. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 150, 267–287, 2022. <https://doi.org/10.1007/s11240-022-02298-1>

Acosta, Y.; Pérez, L.; Escalante, D.; Mazorra-Calero, C.; Martínez-Melo, J.; Martínez-Montero, M.E.; Fortes, D.; Hajari, E.; Lorenzo, J.C.; Fontes, D. Exposure of *Teramnus labialis* (L.F.) spreng seeds to liquid nitrogen does not affect nutritional status of field grown adult plants. **CryoLetters**, v. 42, n.2, p. 106-110.

Arguedas, M.; Villalobos, D.G.; Hernández, L.; Zevallos, E.B.; Cejas, L.Y.; Martínez-Montero, M.E.; Lorenzo, J.C. Field performance of cryopreserved seed-derived maize plants. **CryoLetters**, v. 39, n.6, p. 366-370, 2018

Barros C. F. C. P. P. **Criopreservação de sementes de espécies florestais do bioma Pantanal**. Mestrado em Genética e melhoramento de plantas. Universidade do Estado do Mato grosso, Tangará da Serra. 2018. [https://sucupira.capes.gov.br/sucupira/public/consultas/coleta/trabalhoConclusao/viewTrabalhoConclusao.jsf?popup=true&id\\_trabalho=7210064](https://sucupira.capes.gov.br/sucupira/public/consultas/coleta/trabalhoConclusao/viewTrabalhoConclusao.jsf?popup=true&id_trabalho=7210064)

Benson, E. E. Cryopreservation. In: Dixon R. A., Gonzales R. A. *Plant Cell Culture A Practical Approach* 2<sup>nd</sup> edition. IRL Press Oxford University Press, UK. p.147 – 167, 1994.

Benson, E.E.; Harding, K., Ryan, M., Petrenko, A.; Petrenco Y.; Fuller, B. Alginate encapsulation to enhance biopreservation scope and success: A multidisciplinary review of current ideas and applications in cryopreservation and non-freezing storage. **CryoLetters**, v. 39, n. 1, p. 14-38, 2018.

Bettoni, J.C.; Bonnart, R.; Shepherd, A.N.; Kretzschmar, A.A., Volk, G.M. Modifications to a *Vitis* short tip cryopreservation procedure: effect of shoot tip size and use of cryoplates. **CryoLetters**, v. 40, n. 2, p. 103-112, 2019.

Bettoni, J.C., Bonnart, R. & Volk, G.M. Challenges in implementing plant shoot tip cryopreservation technologies. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 144, 21–34, 2021. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01846-x>

Beulé, T.; Ilbert, P.; Adeoti, K.; Durand-Gasselin, T.; Dumet, D.; Engelmann, F.; Morcillo, F. Recovery of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). somatic embryos cryostored for 20 years. **CryoLetters**, v. 39, n.1., p. 60-66.

Bi, W., Saxena, A., Ayyanath, MM. *et al.* Conservation, propagation, and redistribution (CPR) of Hill's thistle: paradigm for plant species at risk. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 145, p. 75–88, 202. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01993-1>

Cabral A. L. **Superação de dormência, alterações fisiológicas e bioquímicas de sementes de *Sapindus saponaria* L. no processo de germinação durante o armazenamento**. Doutorado em Ciências Agrárias – Agronomia. Instituto federal de educação, ciência e tecnologia goiano. Rio Verde - GO. 2018.

[https://sucupira.capes.gov.br/sucupira/public/consultas/coleta/trabalhoConclusao/viewTrabalhoConclusao.jsf?popup=true&id\\_trabalho=6314059](https://sucupira.capes.gov.br/sucupira/public/consultas/coleta/trabalhoConclusao/viewTrabalhoConclusao.jsf?popup=true&id_trabalho=6314059)

Carmona-Martín, E., Regalado, J.J., Perán-Quesada, R. *et al.* Cryopreservation of rhizome buds of *Asparagus officinalis* L. (cv. Morado de Huétor) and evaluation of their genetic stability. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. **133**, 395–403, 2018. <https://doi.org/10.1007/s11240-018-1392-y>

Carvalho L. S. O. **Transformação genética, Propagação em Biorreatores e Criopreservação de Eucaliptos**. Doutorado em Agronomia. Universidade Federal de Lavras. 2019. [https://sucupira.capes.gov.br/sucupira/public/consultas/coleta/trabalhoConclusao/viewTrabalhoConclusao.jsf?popup=true&id\\_trabalho=7685155](https://sucupira.capes.gov.br/sucupira/public/consultas/coleta/trabalhoConclusao/viewTrabalhoConclusao.jsf?popup=true&id_trabalho=7685155)

Carvalho T. C., Ayub R. A., Gonçalves E. C. P., Reis C. A. Cryopreservation of zygotic embryos of syringe (*Havea brasiliensis*) containing reserve fabric. *Ciênc. Florest.* 31, 2021. <https://www.scielo.br/j/cflo/a/pNJdNvhskkwbNq5LPv7Gdwy/?lang=pt>

Campello, L.G.B.; Turine, J.A.V.; Ferreira, R.O. A Proteção Jurídica Internacional do Bioma Pantanal na era do Antropoceno à luz das constituições do Brasil, Bolívia e Paraguai. **Revista Direitos Culturais**, v.16, p. 101-119, 2021.

Chaipanich, V.V.; Roberts, D.L.; Yenchon, S.; Te-chato, S.; Divakaran, M. Development of cryopreservation protocol for *Vanilla siamensis*: an endangered orchid species in Thailand. **CryoLetters**, v. 40, n.1, p. 305-311, 2019.

Chen, H.Y., Liu, J., Pan, C. *et al.* *In vitro* regeneration of adventitious buds from leaf explants and their subsequent cryopreservation in highbush blueberry. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 134, 193–204, 2018. <https://doi.org/10.1007/s11240-018-1412-y>

Choi, C.H.; Popova, E., Lee, H.; Park, S.U. Cryopreservation of endangered wild species *Aster altaicus* var *Uchiyamae* Kitam, using dropet-vitrification procedure. **CryoLetters**, v. 40, n. 2, p. 113-122, 2019.

Civatti, L.M.; Marchi, M.N.G.; Silva, G.T.; Assis, J.G.A.; Bellintani, M.C. Cryopreservation of plants germplasm native to Brazil. **African Journal of Biotechnology**, v. 13, p. 3847-3859, 2014.

Costa R.N; Mello R. Um panorama sobre a biologia da conservação e as ameaças à biodiversidade brasileira: An overview on conservation biology and threats to Brazilian biodiversity. 2020. **Sapiens**, v. 2, n. 2-jul./dez. 2020 – p. 50-69.

Delgado-Aceves, L., Portillo, L., Folgado, R. *et al.* New approaches for micropropagation and cryopreservation of *Agave peacockii*, an endangered species. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 150, p. 267-287, 2022. <https://doi.org/10.1007/s11240-022-02246-z>

- Devi, S.D.; Kumaria, S.; Das, M.C. Development of cryopreservation protocol for *Aquilaria malaccensis* Lam., a recalcitrant seeded tropical tree species. **CryoLetters**, v. 40, n.1, p. 18-27, 2019.
- Dinato, N.B.; Santos, I.R.I.; Vigna, B.B.Z.; Paula, A.F.; Fávero, A.P. Perspective: pollen cryopreservation for plant breeding and genetic resources conservation. **CryoLetters**, v. 41, n. 3, p.: 115-127, 2020.
- Echer, R.; Cruz, J.A.W.; Estrela, C.C.; Moreira, M. ; Gravato, F. Usos da terra e ameaças para a conservação da biodiversidade no bioma Pampa, Rio Grande do Sul. **Revista Thema**, v. 12, p. 4-13, 2015.
- Ekinci, M.H., Kayhan, D.S., Kayhan, C. *et al.* The role of microRNAs in recovery rates of *Arabidopsis thaliana* after short term cryo-storage. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 144, 281–293, 2021. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01811-8>
- Engelmann, F.; Dussert, S. Cryopreservation. In: Normah, M.N.; Chin, H.F.; Reed, B.M. (eds) Conservation of Tropical Plant Species. Springer London, p.107-117, 2013.
- Espasandin, F.D., Brugnoli, E.A., Ayala, P.G. *et al.* Long-term preservation of *Lotus tenuis* adventitious buds. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 136, 373–382, 2019. <https://doi.org/10.1007/s11240-018-1522-6>
- Etensa, Y.; Gonzáles-Morales, A.; Linares, C.; Vásquez, J.G.; Martínez-Montero, M.E.; Zevallos-Bravo, B.E.; Hajari, E.; Vicente, O.; Villalobos-Olivera, A.; Lorenzo, J.C. Exposure of *Calophyllum antillanum* seeds to liquid nitrogen delays seedling emergence and decreases leaf anthraquinones. **CryoLetters**, v. 43, n.1, p. 58-65, 2022.
- Fang, J.Y.; Wetten, A. C.; Hadley, P. - Cryopreservation of cocoa (*Theobroma cacao* L.) somatic embryos for long-term germplasm. **Plant Science**, v. 166, n.3, p. 669-675. DOI: 10.1016/j.plantsci.2003.11.002
- Faria, N.O. O Bioma Cerrado e a Extinção do Lobo-Guará. Dissertação (graduação em biologia). Universidade de Brasília. 33, p. 2012. [https://jbb.ibict.br/bitstream/1/1032/1/2012\\_NilzaOliveiradeFaria.pdf](https://jbb.ibict.br/bitstream/1/1032/1/2012_NilzaOliveiradeFaria.pdf)
- Fearnside, P.M. Destruição e Conservação da Floresta Amazônica, Vol. 1. Editora do INPA, Manaus. 368 p. 2021.
- Ferrari E. A. P., Colombo R. C., Faria R. T., Neves C. T. V., Vero F. S. Degree of moisture in seeds for the cryopreservation of orchids native to Brazil. **Cienc. Rural**. 50, 2020. <https://www.scielo.br/j/cr/a/N7rzWrfcGnzzHFNmzZScjc/?lang=en>
- Figueiredo M. A., Rosa D. V. F., Ricaldone M. A., Pereira C. C., Coelho S. V. B., Silva L. C. Physiological, biochemical, and ultrastructural aspects of *Coffea arabica* L. seeds under different cryopreservation protocols. **Ciênc. Agrotec.** 45, 2021. <https://www.scielo.br/j/cagro/a/Jw94wczLckJn8ckK5VwDhwd/?lang=en>

Fileti, J.F.; Hengling, M.M.; Gianeti, T.M.R.; Pritchard, H.W.; Hosomi, S.T., Machado-Neto, N.B.; Custódio, C.C. Seed longevity and cryobiotechnology in the orchid genus *Cattleya*. **CryoLetters**, v. 42, n. 6, p. 353-365, 2021.

Filgueira, H. J. A. Os desastres relacionados com fenômenos naturais no contexto dos sistemas organizacionais. João Pessoa: Editora Universitária da UFPB, 144 p., 2013.

Fundação SOS Mata Atlântica. Mata Atlântica. Disponível em: <https://www.sosma.org.br/conheca/mata-atlantica>. 2021. Acesso em: 27, fev de 2022.

Funnekotter B., Bunn E., Mancera R.L. Cryo-mesh: a simple alternative cryopreservation protocol. **CryoLetters**, v. 38, p.155–159, 2017.

Generoso A. L. **Conservação e cultivo *in vitro* de embriões de maracujazeiro-azedo (*Passiflora edulis*)**. Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. UENF/CCTA. 2018. [https://sucupira.capes.gov.br/sucupira/public/consultas/coleta/trabalhoConclusao/viewTrabalhoConclusao.jsf?popup=true&id\\_trabalho=5625522](https://sucupira.capes.gov.br/sucupira/public/consultas/coleta/trabalhoConclusao/viewTrabalhoConclusao.jsf?popup=true&id_trabalho=5625522)

Gerhardt R.G. **Propagação vegetativa de porta-enxertos de *Prunus spp* e criopreservação de *Prunus avium***. Tese de doutorado. Instituto de Biologia. Universidade Federal de Pelotas. RS. Brasil. 2018. [http://guaiaca.ufpel.edu.br:8080/bitstream/prefix/4331/1/resumo\\_tese\\_gabriela\\_gerhardt\\_da\\_rosa.pdf](http://guaiaca.ufpel.edu.br:8080/bitstream/prefix/4331/1/resumo_tese_gabriela_gerhardt_da_rosa.pdf)

Giovana E. **Influência da Temperatura de Armazenamento na Viabilidade de Sementes de *Bowdichia Virgilioides Kunth***. Mestrado em Ciências Ambientais. Universidade Federal de Alfenas, Unifal - MG. 2019. [https://sucupira.capes.gov.br/sucupira/public/consultas/coleta/trabalhoConclusao/viewTrabalhoConclusao.jsf?popup=true&id\\_trabalho=7660503](https://sucupira.capes.gov.br/sucupira/public/consultas/coleta/trabalhoConclusao/viewTrabalhoConclusao.jsf?popup=true&id_trabalho=7660503)

Gladfelter, H.J., Johnston, J., Wilde, H.D. *et al.* Somatic embryogenesis and cryopreservation of *Stewartia* species. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 144, 211–221 (2021). <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01834-1>

Gowthami, R.; Sharma, N.; Gangopadhyay, K.K., Rajkumar<sup>2</sup>, S., Pathania, P.; Anuradha Agrawal, A. Cryopreservation of pollen of *Abelmoschus moschatus* Medik. *subsp. moschatus* as an aid to overcome asynchronous flowering for wide hybridization with cultivated okra [*A. esculentus* (L.) Moench]. **CryoLetters**, v. 42, n. 4, p. 233-244, 2020.

Guterres S. M. **Influência de diferentes espectros luminosos na recuperação de culturas nodulares criopreservadas e na germinação de sementes de *Vriesea reitzii* Leme & A.F. Costa**. Tese de dissertação. Centro de ciências agrárias. Universidade Federal de Santa Catarina.

Hambeck, M.; Senula, A.; Kodym, A. Occurrence of latent bacteria during cryopreservation of long-term *in vitro* cultures of coltsfoot, *Tussilago farfara*. **CryoLetters**, v. 40, n. 6, p. 333-340, 2019

Hammond, S.D.H., Viehmannova, I., Zamecnik, J. et al. Droplet-vitrification methods for apical bud cryopreservation of yacon (*Smallanthus sonchifolius* (Poepp. and Endl.) H. Rob.). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 147, p. 197–208, 2021. <https://doi.org/10.1007/s11240-021-02116-0>

Han, K.; Jaganathan, G.K.; He, L.; Han, Y.; Liu, B. Cryopreservation of *Borassus flabellifer* L. (Arecaceae) using excised embryos: a first report for the genus *Borassus*. **CryoLetters**, v. 42, n. 5, p. 267-271.

Jitsopakul, N.; Homchan, P.; Thammasiri, K. Cryopreservation of orchid pollinia using the V Cryo-Plate method. **CryoLetters**, v. 42, n. 1, p. 25-32, 2020.

Kodim, A.; Senula, A.; Temsch, E.M.; Hood-Nowotony, R.; Schumacker, F.; Zotchev, S.B.; Kiehn, M. Micropropagation and cryopreservation of the endangered plant species *Artemisia laciniata* (Asteraceae). **Cryoletters**, v. 39, n.3, p. 177-189, 2018.

Kulus, D., Rewers, M., Serocka, M. et al. Cryopreservation by encapsulation-dehydration affects the vegetative growth of chrysanthemum but does not disturb its chimeric structure. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 138, 153–166, 2019. <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01614-6>

Kulus, D., Tymoszek, A. Gold nanoparticles affect the cryopreservation efficiency of in vitro-derived shoot tips of bleeding heart. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 146, 297–311, 2021. <https://doi.org/10.1007/s11240-021-02069-4>

Lata, H.; Uchendu, E.; Chandra, S.; Majumdar, C.G.; Khan, I.A.; Elsohly, A. Cryopreservation of axillary buds of *Cannabis sativa* L. by V-cryoplate droplet-vitrification: the critical role of sucrose preculture. **CryoLetters**, v. 40, n. 5, p. 291 - 298, 2019.

Lédo A. S., Jenderek M., Skogerboe D., Staats E. Machado C. A., Oliveira L. A. R. O. Cryopreservation of zygotic embryos of the Brazilian Green Dwarf coconut. **Pesq. Agropec. Bras.** 53, 2018. <https://www.scielo.br/j/pab/a/sfhL6M7FtLrY7HH9thLvznm/?lang=en>

Lédo A. S., Santana F. V., Oliveira A. C. A., Oliveira. L. A. R., Silva A. V. C. Cryopreservation of Brazilia Green dwarf coconut plumules by droplet-vitrification. **Cienc. Rural** 50 (1). 2020. <https://www.scielo.br/j/cr/a/4wwq8nBsZxMR3ZKLrflQ4wD/?lang=en>

Lee, H.; Park, H.; Popova, E.; Lee, Y.Y.; Park, S.U.; Kim, H.H. Ammonium-free medium is critical for regeneration of shoot tips of the endangered species *Pogostemon yatabeanus* cryopreservation using droplet-vitrification. **CryoLetters**, v. 42, n. 5, p. 290-299, 2021.

Linerós, Y., Balocchi, C., Muñoz, X. et al. Cryopreservation of *Pinus radiata* embryogenic tissue: effects of cryoprotective pretreatments on maturation ability. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 135, p. 357–366, 2018. <https://doi.org/10.1007/s11240-018-1469-7>

Londe L. C. N., Vendrame W. A., Sanaei M., Oliveira A. Cryopreservation of banana's cv Grand Naine in vitro rhizomes. **Acad. Bras. Ciênc.** 90, 2018. <https://www.scielo.br/j/aabc/a/4W6QN5gMMwFTWhXP7J8JDYx/?lang=en>

Lopes C. A. **Condicionamento fisiológico e Conservação de Sementes de Tabaco.** Doutorado em Agronomia. Universidade de Lavras. UFLA. 2019. [https://sucupira.capes.gov.br/sucupira/public/consultas/coleta/Nicotiana tabacum trabalhoConclusao/viewTrabalhoConclusao.jsf?popup=true&id\\_trabalho=7675564](https://sucupira.capes.gov.br/sucupira/public/consultas/coleta/Nicotiana%20tabacum%20trabalhoConclusao/viewTrabalhoConclusao.jsf?popup=true&id_trabalho=7675564)

Luciano K. M. F., Mata M. E. R. M. C., Fortes M. Duarte M. E. M. Modeling of the kinetics of cryogenic freezing of lima bean seeds as a function of initial water content. **Eng. Agric.** 39, 2019. <https://www.scielo.br/j/eagri/a/rVzBGp4vnfRfNsfr7tyj3Lr/?lang=en>

Machado, A.B.M., Drummond, G.M. & Paglia, A.P. (eds.) Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção. Ministério do Meio Ambiente, Brasília. Série Biodiversidade. v.2, p. 1420, 2008.

Malik, S.K.; Choudhary, R.; Kaur, S.; Chaudhury, R.; Pritchard, H.W. Storage behavior and cryopreservation of *Citrus cavaleriei*, an endangered, cold-resistant species of northeast India with exceptionally large seeds. **CryoLetters**, v.41, n.5, p. 281-290, 2020.

Manamela, M.T.; Mycock, D.J. Responses of the buds of three south African weevil potato (*Ipomoea batatas*) accessions to different cryoprotectants. **CryoLetters**, v. 40, n. 6, p. 357-366.

Marques, A. A. B.; Fontana, C. S.; Velez, E.; Bencke, G. A. Reis, R. E. Lista de referência da fauna ameaçada de extinção no Rio Grande do Sul: Decreto estadual n. 41.672. Publicações avulsas FZB, Porto Alegre n.11, p. 52, 2002.

Maślanka, M., Szewczyk, A. Droplet-vitrification cryopreservation of *Tulipa tarda* Stapf. apical meristems. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 144, 91–95, 2021. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01910-6>

Mathew, L., Burritt, D.J., McLachlan, A. *et al.* Combined pre-treatments enhance antioxidant metabolism and improve survival of cryopreserved kiwifruit shoot tips. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 138, 193–205, 2019. <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01617-3>

Ministério do Meio Ambiente. O Bioma Cerrado. Disponível em: <https://antigo.mma.gov.br/biomas/cerrado.html>. 2020. Acesso em: 06, mar de 2022.

Montoya-Serrano, F. S, Dal Vesco L., Pescador R., Costa A.F. Seeds cryopreservation of *Vriesea reitzii* Leme & A.F. Costa endemic bromeliad from Atlantic Rainforest. **Hoheneia**. 49, 2022. <https://www.scielo.br/j/hoheneia/a/RF8CTfFVR4WM8gtsCXkb9Md/?lang=en>

Morais R. M. **Micropropagação e criopreservação de *Tabebuia rosealba* (Ridley) Sandwith e *Cybistax antisiphilitica* (Martius) Martius.** Doutorado em Agronomia. Universidade Federal de Lavras. 2018. [https://sucupira.capes.gov.br/sucupira/public/consultas/coleta/trabalhoConclusao/viewTrabalhoConclusao.jsf?popup=true&id\\_trabalho=6395770](https://sucupira.capes.gov.br/sucupira/public/consultas/coleta/trabalhoConclusao/viewTrabalhoConclusao.jsf?popup=true&id_trabalho=6395770)

Nair, D.S.; Reghunath, B.R., Soni, K.B., Alex, S. Cryopreservation of encapsulated axillary buds of *Clitoria ternatea* (L.). **CryoLetters**, v 40, n.1, p. 28 – 35, 2019.

Nascimento C. M. **Criopreservação e sementes sintéticas de Jenipapeiro. Tese de dissertação.** Universidade Federal de Sergipe. 2018. [https://ri.ufs.br/bitstream/riufs/11712/2/CYNTIA\\_MAIA\\_NASCIMENTO.pdf](https://ri.ufs.br/bitstream/riufs/11712/2/CYNTIA_MAIA_NASCIMENTO.pdf)

Nascimento, J.P.B.; Meiado, M.V. *In situ* or *ex situ* seed conservation: which is the more effective way to maintain seed longevity of an endangered cactus Plant Species Biology, v. 32, p. 115-120. 2016.

Nishizawa, W.A., Sakai, A., Amano A.Y, Matsuzawa, T. Cryopreservation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) embryogenic suspension cells and subsequent high plant regeneration by vitrification. **Plant Science**, v.91, p. 67-73, 1993.

Niino T., Yamamoto S., Fukui K. Martínez C .R.C., Arizaga M.V., Matsumoto T., Engelmann F. (2013) Dehydration improves cryopreservation of mat rush (*Juncus decipiens* Nakai) basal stem buds on cryo-plates. **CryoLetters**, v. 34, p. 549–560, 2013.

O'Brien, C., Hiti-Bandaralage, J.C.A., Folgado, R. *et al.* First report on cryopreservation of mature shoot tips of two avocado (*Persea americana* Mill.) rootstocks. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 144, 103–113, 2021. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01861-y>

Ochatt, S., Lambardi, M., Panis, B. *et al.* Cryopreservation and *In Vitro* banking: a cool subject – Preface from the editors. **Plant Cell Tissue and Organ Culture** v. 144, p. 1–5, 2021. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01985-1>

Oliveira, A.C.; Léo, A.S.; Polek, M. *et al.* Optimization of in vitro germination and cryopreservation conditions for preserving date palm pollen in the USDA National Plant Germplasm System. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 144, p. 223–232, 2021. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01907-1>

Panis B., Piette B., Swennen R. Droplet vitrification of apical meristems: a cryopreservation protocol applicable to all Musaceae. **Plant Science** v. 168, p. 45–55, 2005.

Pathirana, R., Mathew, L. & McLachlan, A. A simplified method for high recovery of kiwifruit (*Actinidia* spp.) shoot tips after droplet vitrification cryopreservation suitable for long-term conservation. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 144, 97–102, 2021. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01860-z>

Paula J. C. B., Guariz H.R., Júnior W. A. R., Shimizu G. D., Faria R. T., Oliveira H. C., Cryopreservation of seeds of the Brazilian native species aroeira-do-sertão (*Astronium urundeuva* M. Allemão Engl.). **Rev. Caatinga**, 35, 2022. <https://www.scielo.br/j/rcaat/a/d4Q7jDz8rtcvtzWNbsRBQBWF/?lang=en>.

Paula J. C. B., Bertoncelli D. J., Alves G. A. C., Men G. B., Mathias T. F. Faria. R. T. Cryoprotectant solutions in star orchid seeds and bamboo orchid conservation in liquid nitrogen. **Ornam. Hortic.** 24, 2018. <https://www.scielo.br/j/oh/a/dgMtVtz8XJpQ8CxwsGBT8tH/?lang=en>

Pence, V.C.; Chaiken, M.F. Shoot tip cryopreservation as a conservation tool for species of *Quercus*: effects of species and environment on recovery. **CryoLetters**, v. 42, n. 3, p. 159-169, 2020.

Peng, C., Gao, F., Wang, H. *et al.* Optimization of maturation process for somatic embryo production and cryopreservation of embryogenic tissue in *Pinus koraiensis*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 144, p. 185–194, 2021. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01918-y>

Pereira S. T. S. **Germinação de sementes e conservação de orquídeas nativas das Américas**. Tese de dissertação. Universidade Estadual Paulista. 2022. [https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/192448/pereira\\_sts\\_dr\\_jabo\\_par.pdf?sequence=4&isAllowed=y](https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/192448/pereira_sts_dr_jabo_par.pdf?sequence=4&isAllowed=y)

Pereira S. T. S., Vendrame W. A., Pivetta K. F. L., Sorgato J. C., Faria R. T. Efficiency of cryoprotectors for cryopreservation of two orchid species from Americas. **Rodriguésia**, 72, 2021. <https://www.scielo.br/j/rod/a/fWnrXRvfTx6x4ZsPGMptxts/?lang=en>

Pilatti, F.; Aguiar, T.; Simões, T.; Benson, E.; Viana, A. In vitro and cryogenic preservation of plant biodiversity in Brazil. **In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant**, v. 47(1), p. 82-98. 2011.

Popova, E., Shukla, M., Kim, HH. *et al.* Root cryobanking: an important tool in plant cryopreservation. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 144, 49–66, 2021. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01859-6>

Rafaeli K. E., S.O., Souza. A. V., Carvalho L.S.O., Paiva L.V. Influence of ethylene glycon *Eucalyptus grandis* cryopreservation using the V cryo-plate technique. **Crop Breed Appl. Biotechnol.** 22, 2022. <https://www.scielo.br/j/cbab/a/8HyQ6XVv35KQRVyWtrkmszb/?lang=en>

Rantala, S., Kaseva, J., Karhu, S. *et al.* Cryopreservation of *Ribes nigrum* (L.) dormant buds: recovery via in vitro culture to the field. **Plant Cell Tissue and Organ Culture** 138, 109–119, 2019. <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01607-5>

Rasl, T., Schalk, M., Temsch, E. *et al.* Direct cryopreservation of winter-acclimated buds of *Dracocephalum austriacum* (Lamiaceae) from field material. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 42, 167–176, 2020. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01850-1>

Ree J.F. **Impermanence of somatic embryogenesis: the effects of and solutions to gradual aging of peach palm (*Bactris gasipaes* Kunth) cultures *in vitro***. Doutorado em Recursos genéticos vegetais. Universidade Federal de Santa Catarina. UFSC. 2019. [https://sucupira.capes.gov.br/sucupira/public/consultas/coleta/trabalhoConclusao/viewTrabalhoConclusao.jsf?popup=true&id\\_trabalho=8818156](https://sucupira.capes.gov.br/sucupira/public/consultas/coleta/trabalhoConclusao/viewTrabalhoConclusao.jsf?popup=true&id_trabalho=8818156)

Ree, J.F., Guerra, M.P. Exogenous inorganic ions, partial dehydration, and high rewarming temperatures improve peach palm (*Bactris gasipaes* Kunth) embryogenic cluster post-vitrification regrowth. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 144, 157–169 (2021). <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01852-z>

Reed B. M., Gupta S., Uchendu E. E. In Vitro Genebanks for Preserving Tropical Biodiversity. In: Normah, M. N., Chin, H. F., Reed B. M. (eds) Conservation of Tropical Plant Species. Springer London. p. 77 – 106, 2013.

Ren, R., Jiang, X., Di, W. *et al.* HSP70 improves the viability of cryopreserved *Paeonia lactiflora* pollen by regulating oxidative stress and apoptosis-like programmed cell death events. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 139, p. 53–64, 2019. <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01661-z>

Ren, R.; Li, Z.; Zhou, H. *et al.* Changes in apoptosis-like programmed cell death and viability during the cryopreservation of pollen from *Paeonia suffruticosa*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 140, p. 357–368, 2020. <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01732-1>

Ren, R., Zhou, H., Zhang, L. *et al.* ROS-induced PCD affects the viability of seeds with different moisture content after cryopreservation. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 148, p. 623–633, 2022. <https://doi.org/10.1007/s11240-021-02219-8>

Romo-Paz, F.J.; Folgado, R., Delgado-Aceves, L. *et al.* Tissue culture of *Physalis angulata* L. (Solanaceae): techniques for micropropagation and germplasm long-term preservation. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 144, 73–78, 2021. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01970-8>

Saavedra, A.M., de Castro, T.C., da Silva Cordeiro, L. *et al.* *In vitro* propagation and cryopreservation of the medicinal species *Hovenia dulcis* Thunb. (Rhamnaceae). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 144, p. 577–591, 2021. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01980-6>

Salomão A. N., Santos I. R. I., José S. C. B. R. Cryopreservation of *Pyrostegia venusta* (ker Gawl.) Miers seeds. **Hoehnea** 47, 2020. <https://www.scielo.br/j/hoehnea/a/7fkXJntFZHb4J8CgPztymhy/?lang=en>

Santana F. V. Criopreservação de espécies frutíferas tropicais. Tese de dissertação. Universidade Federal de Sergipe. 2018. [https://ri.ufs.br/bitstream/riufs/11713/2/FERNANDA\\_VIEIRA\\_SANTANA.pdf](https://ri.ufs.br/bitstream/riufs/11713/2/FERNANDA_VIEIRA_SANTANA.pdf)

Santos T. P. **Criopreservação e Germinação de Sementes de Bananeira**. Mestrado em Recursos genéticos vegetais. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas. UFRB e EMBRAPA. 2018.

[https://sucupira.capes.gov.br/sucupira/public/consultas/coleta/trabalhoConclusao/viewTrabalhoConclusao.jsf?popup=true&id\\_trabalho=6441587](https://sucupira.capes.gov.br/sucupira/public/consultas/coleta/trabalhoConclusao/viewTrabalhoConclusao.jsf?popup=true&id_trabalho=6441587)

Sarmiento, M.B. - Agronegócio na região da Campanha Gaúcha, RS: ameaças e desafios: Acesso 06 Mar 2021. A file:///C:/Users/user/Downloads/Agronegocio no Pampa 2021.

Sakai, A.; Kobayashi, S.; Oiyama, I.E. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka by vitrification. **Plant Cell Reports**, v. 9, p. 30-33, 1990.

Senula, A.; Buchner, E.R.; Keller, J.; Nagel, M. An improved cryopreservation protocol for *Mentha* spp. based on PVS3 as the cryoprotectant. **CryoLetters**, v. 39, n. 6, p. 345-353, 2018.

Sharma, S.; Parasher, K.; Mukherjee P.; Sharma, Y.P. Cryopreservation of a threatened medicinal plant, *Valeriana jatamansi* Jones, using vitrification and assessment of biosynthetic stability of regenerants. **CryoLetters**, v. 42, n.5, p. 300-308, 2021.

Silva S. S. S. **Multiplicação in vitro e conservação de espécies endêmicas e vulneráveis de bromeliáceas**. Mestrado em Recursos genéticos vegetais. Universidade Federal de recôncavo da Bahia, cruz das almas, UFRB e EMBRAPA. 2018. [https://sucupira.capes.gov.br/sucupira/public/consultas/coleta/trabalhoConclusao/viewTrabalhoConclusao.jsf?popup=true&id\\_trabalho=6337781](https://sucupira.capes.gov.br/sucupira/public/consultas/coleta/trabalhoConclusao/viewTrabalhoConclusao.jsf?popup=true&id_trabalho=6337781)

Silva S.S.S., Souza E.H., Souza F.V.D., Max D.A.S., Rossi M.L., Costa M.A.P. Post-seminaral development and cryopreservation of endemic or endangered bromeliads. **An. Acad. Bras. Ciên**, v. 93, n. 1, 2021. <https://doi.org/10.1590/0001-3765202120191133>

Simao M. J. **Investigação de aspectos fitoquímicos e do potencial farmacológico de materiais obtidos in vivo, in vitro e criopreservados de *Passiflora pohlii* Mast**. Doutorado em Biologia Vegetal. Universidade do Estado do Rio De Janeiro. UERJ. SIRIUS. CTC-A. 2019. [https://sucupira.capes.gov.br/sucupira/public/consultas/coleta/trabalhoConclusao/viewTrabalhoConclusao.jsf?popup=true&id\\_trabalho=7680501](https://sucupira.capes.gov.br/sucupira/public/consultas/coleta/trabalhoConclusao/viewTrabalhoConclusao.jsf?popup=true&id_trabalho=7680501)

Singh, S.; Thangjam, R.; Harish, G.D. *et al.* Conservation protocols for *Ensete glaucum*, a crop wild relative of banana, using plant tissue culture and cryopreservation techniques on seeds and zygotic embryos. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 144, 195–209, 2021. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01881-8>.

Souza. J. A. **Crioterapia por Vitriificação em Gotas da Erradicação das Espécies Virais Apple stem grooving vírus e Apple stem pitting vírus em Plantas do Porta – Enxerto de Macieira “Marubakaido”**. Mestrado em Produção Vegetal. Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages. UDESC/CAV. 2019. [https://sucupira.capes.gov.br/sucupira/public/consultas/coleta/trabalhoConclusao/viewTrabalhoConclusao.jsf?popup=true&id\\_trabalho=7856750](https://sucupira.capes.gov.br/sucupira/public/consultas/coleta/trabalhoConclusao/viewTrabalhoConclusao.jsf?popup=true&id_trabalho=7856750)

Souza, R. R. **Micropropagation and cryopreservation of *Genipa americana* L.** Doutorado em Agronomia. Universidade Federal de Lavras. 2018. [https://sucupira.capes.gov.br/sucupira/public/consultas/coleta/trabalhoConclusao/viewTrabalhoConclusao.jsf?popup=true&id\\_trabalho=6314304](https://sucupira.capes.gov.br/sucupira/public/consultas/coleta/trabalhoConclusao/viewTrabalhoConclusao.jsf?popup=true&id_trabalho=6314304)

Su, P., Wang, D., Kan, W. *et al.* Melatonin different - increasing the cryopreservation recovery rate of shoot tips of *Chrysanthemum morifolium* cv. Chuju by regulating the level of oxidative stress. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 149, 785–797 (2022). <https://doi.org/10.1007/s11240-022-02262-z>

Tanaka, D., Sakuma, Y., Yamamoto, Si. *et al.* Development of – 80 °C storage for *Allium* shoot tips using D cryo-plate method. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 144, p. 115–122, 2021. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01956-6>

Tanner, J.D., Chen, K.Y., Bonnart, R.M. *et al.* Considerations for large-scale implementation of dormant budwood cryopreservation. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 144, 35–48, 202. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01884-5>

Thankappan, S.S.; Morawala-Patel, V. Germplasm conservation techniques and assessment of physiological, biochemical and molecular integrity of indigenous, endangered *Dioscorea prazeri*. **CryoLetters**, v. 42, n.3, 168-177, 2020.

Titova, M.V., Popova, E.V., Shumilo, N.A. Stability of cryopreserved *Polyscias filicifolia* suspension cell culture during cultivation in laboratory and industrial bioreactors. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 145, p. 591–600, 2021. <https://doi.org/10.1007/s11240-021-02030-5>

Vargas D. P., Ferreira L. V., Tanigushi M., Coradin J. H., Dutra L. F. Cryopreservation of a threatened pindo palm species. **Rodriguésia**. 71, 2020. <https://www.scielo.br/j/rod/a/3jmhbHd8tqCz8bTFPMXHQ4J/?lang=pt>

Viana, J. P.; Saccaro J. N. O.; Fraxe N. H. J.; Roma, J. C. O estado da biodiversidade - Parte 1: genes e espécies. In: Albino Rodrigues Alvarez/José Aroudo Mota. (Org.). Sustentabilidade Ambiental no Brasil: biodiversidade, economia e bem-estar humano. 1<sup>ed</sup>. Brasília: Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada, p. 51-74, 2010.

Vilardo, A.F.R.M.; Mendonça, T.F.; Engelmann, F; Cordeiro, L.S.; Albarello, N.; Simões-Gurgel, C. Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of the medicinal species *Cleome spinosa* (Cleomaceae) applying vitrification-based techniques. **CryoLetters**, v. 40, n.4, p. 237 - 246, 2019.

Viljamaa, S., Dikareva, E., Tolonen, J. *et al.* Cryopreservation of the Norway spruce tissue culture line able to produce extracellular lignin. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 133, p. 225–235, 2018. <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1375-4>

Vogiatzi, C.; Grout, B.W.W.; Wetten, A.; Ordidge, M.; Clausen, S.K. Cryopreservation of winter-dormant apple buds IV: Critical temperature variation that can compromise survival. **CryoLetters**, v. 39, n.4, p. 245-250.

Volk, G.M.; Shepherd, A.N.; Bonnart, R. Successful cryopreservation of *Vitis* shoot tips: novel pre-treatment combinations applied to nine species. **CryoLetters**, v. 39, n. 5, p. 322-330, 2018.

Vollmer, R., Villagaray, R., Castro, M. *et al.* Cryopreserved potato shoot tips showed genotype-specific response to sucrose concentration in rewarming solution (RS). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 136, p. 353–363, 2019. <https://doi.org/10.1007/s11240-018-1520>

Walt, K.; Kemp, P.; Sofkova-Bobcheva, S.; Burritt, D.; Nadarajan, J. Evaluation of droplet-vitrification and encapsulation-dehydration for the cryopreservation of *Syzygium maire* zygotic embryos. **CryoLetters**, v. 42, n.4, p. 202-209, 2020.

Wang, MR., Lambardi, M., Engelmann, F. *et al.* Advances in cryopreservation of in vitro-derived propagules: technologies and explant sources. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 144, 7–20, 2021a. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01770-0>

Wang, MR., Hamborg, Z., Slimestad, R. *et al.* Assessments of rooting, vegetative growth, bulb production, genetic integrity and biochemical compounds in cryopreserved plants of shallot. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 144, 123–131, 2021b. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01820-7>

Yamamoto S-i, Rafique T, Priyantha WS, Fukui K, Matsumoto T, Niino T. Development of a cryopreservation procedure using aluminum cryo-plates. **CryoLetters**, v. 32, p. 256–265, 2011.

Zhang, L., Ren, R., Jiang, X. *et al.* Exogenous ethylene increases the viability of cryopreserved *Dendrobium* protocorm-like bodies by regulating the hydrogen peroxide and its mediated oxidative stress. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 145, p. 19–27, 2021a. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01988-y>

Zhang, D., Yang, T. & Ren, L. Y<sub>2</sub>SK<sub>2</sub>- and SK<sub>3</sub>-type dehydrins from *Agapanthus praecox* act as protectants to improve plant cell viability during cryopreservation. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 144, 271–279, 2021b. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01780-y>