



**LARA SIQUEIRA OLIVEIRA CARVALHO**

**TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA, PROPAGAÇÃO EM  
BIORREATORES E CRIOPRESERVAÇÃO DE EUCALIPTOS**

**LAVRAS - MG  
2019**

**LARA SIQUEIRA OLIVEIRA CARVALHO**

**TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA, PROPAGAÇÃO EM BIORREATORES E  
CRIOPRESERVAÇÃO DE EUCALIPTOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, área de concentração Fisiologia de Plantas Cultivadas, para a obtenção do título de Doutora.

Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva  
Orientador

Dr. Maurizio Lambardi  
Coorientador

**LAVRAS - MG  
2019**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA,  
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Carvalho, Lara Siqueira Oliveira.

Transformação genética, propagação em biorreatores e  
criopreservação de eucaliptos / Lara Siqueira Oliveira Carvalho. –  
2019.

123 p. : il.

Orientador: Luciano Vilela Paiva.

Coorientador: Maurizio Lambardi.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2019.

Bibliografia.

1. Celulose. 2. *Agrobacterium tumefaciens*. 3. Sistemas de  
Imersão Temporária. I. Paiva, Luciano Vilela. II. Lambardi,  
Maurizio. III. Título.

**LARA SIQUEIRA OLIVEIRA CARVALHO**

**TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA, PROPAGAÇÃO EM BIORREADORES E  
CRIOPRESERVAÇÃO DE EUCALIPTOS**

**GENETIC TRANSFORMATION, PROPAGATION IN BIORREATORS AND  
CRIOPRESERVATION OF EUCALYPTUS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, área de concentração Fisiologia de Plantas Cultivadas, para a obtenção do título de Doutora.

APROVADA em 06 de fevereiro de 2019.

Profa. Dra. Evânia Galvão Mendonça UFSJ

Dr. Diogo Pedrosa Corrêa UFLA

Prof. Dr. Gilvano Ebling Brondani UFLA

Profa. Dra. Leila Aparecida Salles Pio UFLA

Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva  
Orientador

Dr. Maurizio Lambardi  
Coorientador

**LAVRAS - MG  
2019**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e a Nossa Senhora Aparecida por estarem sempre presentes, principalmente nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais, Marcelo e Marice por todo o incentivo e amor de sempre.

Aos meus irmãos, Laís e Vinícius, pela amizade e carinho.

Aos meus sobrinhos, Pedro e Thomás, pelos momentos de alegria.

As minhas avós, Anizail e Maria Thereza, por todas as orações e carinho.

Ao meu esposo, Fabio, por todo o amor, ajuda e por ser o meu porto seguro, sem você eu não teria chegado até aqui.

Às meninas da República Doce Deleite, pela amizade de sempre e pelos bons momentos que vivemos.

À família do Fabio, pelo acolhimento e carinho.

À Universidade Federal de Lavras, por todo o conhecimento profissional e pessoal que adquiri aqui.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), FAPEMIG e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela oportunidade concedida.

Ao professor, Luciano Vilela Paiva, pela orientação, incentivo e ensinamentos.

Ao professor, Maurizio Lambardi, pela co-orientação, auxílio e ensinamentos.

À Aylin, pela amizade, paciência e disposição em me ajudar.

À todos os amigos do LCBM, inclusive os que já passaram por lá, pelos ensinamentos compartilhados e momentos de distração.

A todos que me ajudaram com meus experimentos enquanto eu estive fora do laboratório, principalmente Naty, Marieli e Rafa.

Aos membros da banca, por aceitar o meu convite e por todas as sugestões e críticas.

Enfim, a todos que contribuíram para que eu chegasse até aqui, obrigada de coração!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

## RESUMO

Neste trabalho foi realizada a transformação genética de *Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus urophylla* com o gene *OsCesA4*, responsável pela biossíntese de celulose na parede celular secundária. Ademais, realizou-se uma revisão bibliográfica e sistemática sobre a micropropagação de espécies arbóreas em Sistemas de Imersão Temporária (TISs). Após, comparou-se a eficiência de três TISs na propagação de *E. grandis* x *E. urophylla*, além de compará-los ao sistema de cultivo semi-sólido. Por fim, foi realizada a otimização do meio de pré-cultivo, tipo de crioprotetor e tempo de exposição, além da eficiência de dois métodos criogênicos para a criopreservação de *E. grandis* X *E. urophylla* e a comparação de duas fontes de explantes com idades diferentes na criopreservação de *E. grandis*. A inserção do gene de interesse *OsCesA4* nas plantas *in vitro* de eucalipto foi confirmada por PCR convencional e visualizada em gel de agarose. Porém, não houve reprodutibilidade deste resultado da PCR realizada com as mesmas plantas depois de aclimatizadas em estufa. Além disso, o gel para confirmação de possível contaminação com *Agrobacterium tumefaciens* foi inconclusivo, visto que todos os eventos e inclusive a planta controle apresentaram amplificação. Estes resultados, juntamente com a não diferença estatística no teor de celulose das plantas controles em relação as que passaram pela transformação, levantaram a hipótese da regeneração de possíveis plantas quimeras. Na revisão sobre TISs, foi observada que a frequência e tempo de imersão foi um dos principais parâmetros estudados nos *papers* analisados e 35% deles trabalharam com espécies de eucalipto. Também observou-se que hiperhidricidade foi o principal problema relatado, e a maioria reportou que plantas propagadas em TISs apresentaram mais sucesso na aclimatização do que as propagadas em meio convencional. Além disso, poucos trabalhos compararam a eficiência de diferentes TISs na propagação de arbóreas, sendo este um ponto possível de ser tratado em estudos futuros. No experimento utilizando TISs, o ElecTIS foi o sistema mais eficiente para a propagação das plantas de *E. grandis* x *E. urophylla*, apresentando média de 14,6 brotos por explante e plantas não hiperhídricas. No experimento da criopreservação de *E. grandis* x *E. urophylla*, o meio de pré-cultivo que se mostrou mais eficiente na sobrevivência das plantas foi o de 0,125; 0,25 e 0,5 M de sacarose/ 24 h em cada concentração. O crioprotetor que apresentou maior porcentagem de sobrevivência das plantas foi o PVS2 com exposição à ele por 15 e 30 minutos. E o método *droplet-vitrification* apresentou maior porcentagem de sobrevivência das plantas depois da criopreservação quando comparado à crioplaca. Ao utilizar os parâmetros otimizados para a criopreservação de *E. grandis* x *E. urophylla* encontrou-se sobrevivência de 30%, valor não considerado como ideal para o armazenamento em criobancos. Para *E. grandis*, explantes originados de plantas com 20 dias apresentaram a maior porcentagem de sobrevivência, com um valor de 48%, enquanto os explantes originados de plantas com 3 anos não sobreviveram, o que mostra a grande influência da idade na recuperação final dos explantes após a criopreservação.

**Palavras-chave:** Celulose. *Agrobacterium tumefaciens*. Sistemas de Imersão Temporária. Pré-cultivo. Crioprotetor.

## ABSTRACT

This work carried out the genetic transformation of *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* with the gene *OsCesA4*, responsible for cellulose biosynthesis in the secondary cell wall. In addition, a bibliographical and systematic review on the micropropagation of arboreal species in Temporary Immersion Systems (TISs) was conducted. Afterwards, the efficiency of three TISs in the propagation of *E. grandis* x *E. urophylla* was compared regarding the semi-solid culture system. Finally, a study was carried out regarding the optimization of the preculture medium, type of cryoprotectant and time of exposure, besides the efficiency of two cryogenic methods for the cryopreservation of *E. grandis* x *E. urophylla* and the comparison of two sources of explants with different ages in cryopreservation of *E. grandis*. The insertion of the gene of interest *OsCesA4* in the in vitro plants of eucalyptus was confirmed by conventional PCR and visualized in agarose gel. However, there was no reproducibility of this PCR result with the same plants after greenhouse acclimatization. In addition, the confirmation gel of possible contamination with *Agrobacterium tumefaciens* was inconclusive, since all events and even the control plant showed amplification. These results, together with the non-statistical difference in the cellulose content of the control plants in relation to those that underwent the transformation, raised the hypothesis of the regeneration of possible chimeras plants. In the review on TISs, it was observed that the frequency and time of immersion was one of the main parameters studied in the analyzed papers and 35% of them worked with eucalyptus species. It was also observed that hyperhydricity was the main problem reported, and most reported that plants propagated in TISs were more successful in acclimatization than those propagated in conventional media. In addition, few studies have compared the efficiency of different TISs in the trees' propagation, which is a possible point to be addressed in future studies. In the experiment using TISs, ElecTIS was the most efficient system for the propagation of *E. grandis* x *E. urophylla* plants, presenting average of 14.6 shoots per explant and nonhyperhydric plants. In the cryopreservation experiment of *E. grandis* x *E. urophylla*, the preculture medium that was most efficient in plant survival was 0.125; 0.25 and 0.5 M sucrose / 24 h at each concentration. The cryoprotectant that presented the highest percentage of plant survival was PVS2 with exposure to it for 15 and 30 minutes. And the droplet-vitrification method presented higher percentage of plant survival after cryopreservation when compared to cryoplate. When using the optimized parameters for the cryopreservation of *E. grandis* x *E. urophylla*, survival of 30% was found, a value not considered ideal for cryobank storage. For *E. grandis*, explants from 20-day-old plants showed the highest percentage of survival, with a value of 48%, while the explants from 3-year-old plants did not survive, which shows the great influence of age on the final recovery of the plants' explants after cryopreservation.

**Keywords:** Cellulose. *Agrobacterium tumefaciens*. Temporary Immersion Systems. Preculture. Cryoprotectant.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

- Figura 1 – Composição da parede celular. A – Parede primária; B – Parede secundária. .... 19
- Figura 2 – Formação das microfibrilas de celulose através do Complexo Celulose Sintase (CCS). ..... 20
- Figura 3 – Sistemas de Imersão Temporária (TISs). ..... 25
- Figura 4 – Esquema do cassete gênico, contendo o gene de seleção *Bar*, seu promotor 35S e o terminador E9, e o gene de interesse *OsCesA4*, com o promotor da Ubiquitina e o terminador NOS. LB – borda esquerda, RB – borda direita. .... 43

### CAPÍTULO 2

- Figura 1 – Gel de agarose com colônias de *Agrobacterium tumefaciens* transformadas. M: marcador molecular de 10000 pb; C+: DNA de *E. coli* transformada; C3.1 50: colônia 3 de *A. tumefaciens* com DNA a 50 ng/μL; C3.1 total: colônia 3.1 de *A. tumefaciens* com DNA sem diluição e C4.1 50: colônia 4.1 de *A. tumefaciens* com DNA a 50 ng/μL. .... 50
- Figura 2 – Gel de agarose da confirmação de 5 eventos contendo o gene de interesse *OsCesA4* em plantas de eucalipto. M: marcador molecular de 10000 pb; C-: controle negativo (água); P-: planta controle (não transformada); E1, E3, E4, E6 e E7: eventos confirmados (cada um representado por uma única planta de eucalipto), E2: planta não confirmada (escape); C+: controle positivo (DNA de *A. tumefaciens* transformada). .... 51
- Figura 3 – Gel de agarose para a confirmação da inserção do cassete gênico nas plantas através do gene *Bar*. M: marcador molecular de 10000 pb; C-: controle negativo (água); P-: planta controle (não transformada); E1, E3, E4, E6 e E7: eventos confirmados (cada um representado por uma única planta de eucalipto), C+: controle positivo (DNA de *A. tumefaciens* transformada). .... 52
- Figura 4 – Gel de agarose para verificação de possível contaminação com *A. tumefaciens* através do gene que confere resistência à estreptomicina e espectinomicina (Sm/Sp). M: marcador molecular de 10000 pb; C-: controle negativo (água); P-: planta controle (não transformada); E1, E3, E4, E6 e E7: eventos confirmados (cada um representado por uma única planta de eucalipto), C+: controle positivo (DNA de *A. tumefaciens* transformada). .... 53

### CAPÍTULO 3

- Figura 1 – Incremento de massa fresca de explantes cultivados em meio semi-sólido e nos biorreatores ElecTIS, SETIS<sup>TM</sup> e *Plantform*<sup>TM</sup>, na frequência de imersão a cada 8 h com imersão de 10 min, aos 21 dias de cultura do híbrido *E. grandis X E. urophylla*..... 76
- Figura 2 – Número de brotos cultivados em meio semi-sólido e nos biorreatores ElecTIS, SETIS e *Plantform*, na frequência de imersão a cada 8 h com imersão de 10 min, aos 21 dias de cultura do híbrido *E. grandis X E. urophylla*. .... 77
- Figura 3 – Brotações de *E. grandis X E. urophylla* aos 21 dias cultivadas em A - meio semi-sólido; B – ElecTIS; C - SETIS<sup>TM</sup> e D - *Plantform*<sup>TM</sup>, na frequência de imersão a cada 8 h com imersão de 10 min..... 77

### CAPÍTULO 4

- Figura 1 – Curvas sacarose de *E. grandis x E. urophylla*. A - Porcentagem de Sobrevivência, B - Porcentagem de Regeneração e C - Brotos/Ápices. Curva 1 – 0,125; 0,25; 0,5; 1 M, B: Curva 2 – 0,125; 0,25; 0,5 M e Curva 3 – 0,5 M. Médias seguidas pelas mesmas letras pertencem ao mesmo grupo pelo teste de *Scott-Knott* ( $p < 0,05$ )..... 96
- Figura 2 – Aspecto visual dos ápices de *E. grandis x E. urophylla* depois de 30 dias do pré-cultivo em sacarose. A - Curva 1: 0,125; 0,25; 0,5; 1 M de sacarose, B - Curva 2: 0,125; 0,25; 0,5 M de sacarose e C - Curva 3: 0,5 M de sacarose. Barra: 1 cm. .... 97
- Figura 3 – Curva de *E. grandis x E. urophylla* utilizando o crioprotetor PVS2 nos tempos 15, 30, 45, 60, 75 e 90 min. A, C e E – Porcentagem de sobrevivência, porcentagem de regeneração e número de brotos por ápice utilizando o método *droplet-vitrification* e B, D e F – Porcentagem de sobrevivência, porcentagem de regeneração e número de brotos por ápice utilizando o método crioplaca. Médias seguidas pelas mesmas letras pertencem ao mesmo grupo pelo teste de *Scott-Knott* ( $p < 0,05$ )..... 98
- Figura 4 – Aspecto visual dos ápices de *E. grandis x E. urophylla* depois de 30 dias da exposição ao crioprotetor PVS2 utilizando o método *droplet-vitrification*. A - 15 min, B - 30 min, C - 45 min, D - 60 min, E - 75 min e F - 90 min. Barra: 1 cm..... 99

- Figura 5 – Aspecto visual dos ápices de *E. grandis* x *E. urophylla* depois de 30 dias da exposição ao crioprotetor PVS2 utilizando o método crioplaca. A - 15 min, B - 30 min, C - 45 min, D - 60 min, E - 75 min e F - 90 min. Barra: 1 cm..... 100
- Figura 6 – Curva de *E. grandis* x *E. urophylla* utilizando o crioprotetor PVS3 nos tempos 15, 30, 45, 60, 75 e 90 min. A, C e E – Porcentagem de sobrevivência, porcentagem de regeneração e número de brotos por ápice utilizando o método *droplet-vitrification* e B, D e F – Porcentagem de sobrevivência, porcentagem de regeneração e número de brotos por ápice utilizando o método crioplaca. Médias seguidas pelas mesmas letras pertencem ao mesmo grupo pelo teste de *Scott-Knott* ( $p < 0,05$ )..... 102
- Figura 7 – Aspecto visual dos ápices de *E. grandis* x *E. urophylla* depois de 30 dias da exposição ao crioprotetor PVS3 utilizando o método *droplet-vitrification*. A - 15 min, B - 30 min, C - 45 min, D - 60 min, E - 75 min e F - 90 min. Barra: 1 cm. .... 103
- Figura 8 – Aspecto visual dos ápices de *E. grandis* x *E. urophylla* depois de 30 dias da exposição ao crioprotetor PVS3 utilizando o método crioplaca. A - 15 min, B - 30 min, C - 45 min, D - 60 min, E - 75 min e F - 90 min. Barra: 1 cm..... 104
- Figura 9 – Curva de *E. grandis* x *E. urophylla* utilizando o crioprotetor VSL nos tempos 15, 30, 45, 60, 75 e 90 min. A, C e E – Porcentagem de sobrevivência, porcentagem de regeneração e número de brotos por ápice utilizando o método *droplet-vitrification* e B, D e F – Porcentagem de sobrevivência, porcentagem de regeneração e número de brotos por ápice utilizando o método crioplaca. Médias seguidas pelas mesmas letras pertencem ao mesmo grupo pelo teste de *Scott-Knott* ( $p < 0,05$ )..... 105
- Figura 10 – Aspecto visual dos ápices de *E. grandis* x *E. urophylla* depois de 30 dias da exposição ao crioprotetor VSL utilizando o método *droplet-vitrification*. A - 15 min, B - 30 min, C - 45 min, D - 60 min, E - 75 min e F - 90 min. Barra: 1 cm. .... 106
- Figura 11 – Aspecto visual dos ápices de *E. grandis* x *E. urophylla* depois de 30 dias da exposição ao crioprotetor VSL utilizando o método crioplaca. A - 15 min, B - 30 min, C - 45 min, D - 60 min, E - 75 min e F - 90 min. Barra: 1 cm..... 107
- Figura 12 – Criopreservação de *E. grandis* x *E. urophylla* utilizando os métodos *droplet-vitrification* e crioplaca. A, C e E - Porcentagem de sobrevivência, porcentagem de regeneração e número de brotos por ápice utilizando o

- método *droplet-vitrification* e B, D e F – Porcentagem de sobrevivência, porcentagem de regeneração e número brotos por ápice utilizando o método crioplaca. Médias seguidas pelas mesmas letras pertencem ao mesmo grupo pelo teste de *Scott-Knott* ( $p < 0,05$ ). ..... 109
- Figura 13 – Aspecto visual dos ápices de *E. grandis* x *E. urophylla* depois de 30 dias da criopreservação. A, C e E – Ápices não criopreservados (LN<sup>-</sup>) expostos a 15, 30 e 60 min ao PVS2 respectivamente e B, D e F – Ápices criopreservados (LN<sup>+</sup>) expostos a 15, 30 e 60 min ao PVS2 respectivamente. Barra: 1 cm. .... 110
- Figura 14 – Porcentagem de sobrevivência dos ápices caulinares de *E. grandis* provenientes de brotações com 20 dias e brotações com 3 anos de idade. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de *Scott-Knott* ( $p < 0,05$ ). ..... 112
- Figura 15 – Aspecto visual dos ápices de *E. grandis* provenientes de brotações com 20 dias e 3 anos de idade depois de 30 dias da criopreservação. A – Ápices não criopreservados (LN<sup>-</sup>) aos 20 dias, B – Ápices criopreservados (LN<sup>+</sup>) aos 20 dias, C – Ápices não criopreservados (LN<sup>-</sup>) aos 3 anos e D – Ápices criopreservados (LN<sup>+</sup>) aos 3 anos. Barra: 1 cm. .... 113

## SUMÁRIO

	<b>CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>13</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>16</b>
<b>2.1</b>	<b>O gênero <i>Eucalyptus</i> e a indústria de celulose.....</b>	<b>16</b>
<b>2.2</b>	<b>Local de ocorrência e biossíntese da celulose .....</b>	<b>18</b>
<b>2.3</b>	<b>Transformação genética via <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....</b>	<b>20</b>
<b>2.4</b>	<b>Genes <i>CesA</i> .....</b>	<b>21</b>
<b>2.5</b>	<b>Micropropagação em Sistemas de Imersão Temporária (TISs) .....</b>	<b>22</b>
<b>2.6</b>	<b>Criopreservação .....</b>	<b>26</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>31</b>
	<b>CAPÍTULO 2 TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE UM HÍBRIDO COMERCIAL DE EUCALIPTO VISANDO O AUMENTO DA SÍNTESE DE CELULOSE .....</b>	<b>40</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>42</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>43</b>
<b>2.1</b>	<b>Local de condução e material vegetal .....</b>	<b>43</b>
<b>2.2</b>	<b>Construção do plasmídeo .....</b>	<b>43</b>
<b>2.3</b>	<b>Confirmação da presença do vetor em <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....</b>	<b>43</b>
<b>2.4</b>	<b>Transformação genética do clone LCBM2.....</b>	<b>45</b>
<b>2.5</b>	<b>Extração do DNA genômico.....</b>	<b>46</b>
<b>2.6</b>	<b>Confirmação da presença do gene <i>OsCesA4</i> através da inserção do cassete gênico nas plantas.....</b>	<b>47</b>
<b>2.7</b>	<b>Enraizamento e aclimatização das plantas.....</b>	<b>48</b>
<b>2.8</b>	<b>Quantificação de celulose na parede celular .....</b>	<b>48</b>
<b>3</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>50</b>
<b>3.1</b>	<b>Confirmação da presença do vetor em <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....</b>	<b>50</b>
<b>3.2</b>	<b>Confirmação da presença do gene <i>OsCesA4</i> por meio da inserção do cassete gênico nas plantas .....</b>	<b>50</b>
<b>3.3</b>	<b>Quantificação de celulose na parede celular .....</b>	<b>53</b>
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>54</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>58</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>59</b>
	<b>ARTIGO DE REVISÃO BIBLIOGRÁFICA E SISTEMÁTICA - TISs .....</b>	<b>61</b>
	<b>CAPÍTULO 3 MICROPROPAGAÇÃO DE <i>Eucalyptus grandis</i> X <i>Eucalyptus urophylla</i> EM DIFERENTES SISTEMAS DE IMERSÃO TEMPORÁRIA (TISs).....</b>	<b>71</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>72</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>74</b>
<b>2.1</b>	<b>Local de condução e material vegetal .....</b>	<b>74</b>
<b>2.2</b>	<b>Multiplicação em biorreator .....</b>	<b>74</b>
<b>3</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>76</b>
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>78</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>82</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>83</b>

	<b>CAPÍTULO 4 CRIOPRESERVAÇÃO DE ÁPICES CAULINARES DE EUCALIPTO PELOS MÉTODOS DE <i>Droplet-vitrification</i> E CRIOPLACA .....</b>	<b>85</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>87</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>89</b>
<b>2.1</b>	<b>Experimento 1 .....</b>	<b>89</b>
<b>2.1.1</b>	<b>Local de condução e material vegetal .....</b>	<b>89</b>
<b>2.1.2</b>	<b>Otimização dos meios de pré-cultivo (curvas de sacarose) .....</b>	<b>89</b>
<b>2.1.3</b>	<b>Otimização de crioprotetores (curva de crioprotetores) e dos métodos criogênicos .....</b>	<b>90</b>
<b>2.1.4</b>	<b>Criopreservação .....</b>	<b>91</b>
<b>2.1.5</b>	<b>Análises estatística .....</b>	<b>92</b>
<b>2.2</b>	<b>Experimento 2 .....</b>	<b>93</b>
<b>2.2.1</b>	<b>Local de condução e material vegetal .....</b>	<b>93</b>
<b>2.2.2</b>	<b>Criopreservação .....</b>	<b>93</b>
<b>2.2.3</b>	<b>Análises estatísticas .....</b>	<b>94</b>
<b>3</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>96</b>
<b>3.1</b>	<b>Experimento 1 .....</b>	<b>96</b>
<b>3.1.1</b>	<b>Otimização dos meios de pré-cultivo (curvas de sacarose) .....</b>	<b>96</b>
<b>3.1.2</b>	<b>Otimização dos crioprotetores (curva de crioprotetores) .....</b>	<b>97</b>
<b>3.1.2.1</b>	<b>Crioprotetor PVS2 .....</b>	<b>97</b>
<b>3.1.2.2</b>	<b>Crioprotetor PVS3 .....</b>	<b>100</b>
<b>3.1.2.3</b>	<b>Crioprotetor VSL .....</b>	<b>104</b>
<b>3.1.3</b>	<b>Criopreservação .....</b>	<b>107</b>
<b>3.2</b>	<b>Experimento 2 .....</b>	<b>111</b>
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>114</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>119</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>120</b>

## CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO GERAL

### 1 INTRODUÇÃO

A indústria brasileira de base florestal é conhecida no mundo inteiro pela alta produtividade de suas áreas plantadas, e pela menor rotação do mundo, resultantes das suas condições de clima e solo (IBÁ, 2017). Esses altos índices se devem principalmente à árvore de eucalipto, originária da Austrália, do Timor e da Indonésia, a qual possui mais de 700 espécies catalogadas, além de diversas variedades e híbridos (AGGARWAL et al., 2010; JÚNIOR; COLODETTE, 2013).

O setor de árvores plantadas no Brasil é responsável por mais de 90% de toda a madeira produzida para fins industriais e de 6,1% do PIB industrial no país. Em relação a árvore de eucalipto o segmento de celulose e papel é o que mais se destaca em relação aos demais segmentos. Sendo que em 2018 ele apresentou uma produção industrial de 19,5 milhões de toneladas, com o Brasil ranqueando a segunda posição de maior produtor de celulose e papel no cenário mundial (IBÁ, 2018).

Segundo a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO), é previsto um aumento de aproximadamente 9,1 bilhões de habitantes da população mundial até 2050. Desta forma, prevê-se um aumento na demanda por madeira para uso industrial e geração de energia, exigindo o plantio adicional de cerca de 250 milhões de hectares de eucalipto em todo o mundo considerando os níveis atuais de produtividade (IBÁ, 2017).

Diante deste cenário, para suprir o fornecimento de madeira para todos os segmentos industriais será necessário o uso de genótipos mais produtivos, com maior qualidade e resistentes à doenças e pragas. Para a obtenção destes genótipos, podem ser utilizadas técnicas biotecnológicas que promovam maiores ganhos em produtividade e sustentabilidade, por meio da melhoria de características até então consideradas impraticáveis pelos métodos de melhoramento convencional (NEHRA et al., 2005; PADAYACHEE et al., 2009).

Dentre as técnicas biotecnológicas, a transformação genética é uma importante ferramenta para obtenção de genótipos superiores de espécies de interesse. A transformação ocorre por meio da introdução de genes exógenos no genoma das plantas, que expressam características que irão possibilitar as espécies gerarem genótipos com maior produtividade e qualidade (SARTORETTO et al., 2008).

Em eucalipto, por exemplo, o estudo de genes relacionados à biossíntese de celulose e lignina é muito importante, pois a atividade destes genes afeta as propriedades da madeira e

do seu crescimento (QUANG et al., 2012). Genes que alteram a composição química da madeira, por exemplo, podem ser úteis para a indústria de celulose, visto que madeiras com alto conteúdo de celulose em relação ao conteúdo de lignina é um atrativo para estas indústrias, não só pelo grande importância que este polímero apresenta a nível industrial, mas também porque existe um alto custo de remoção da lignina da polpa celulósica para a produção de papel de qualidade (VANHOLME et al., 2008).

No entanto, para se obter um eficiente protocolo de transformação genética é necessária uma eficiente taxa de regeneração e propagação das plantas transformadas (RIBEIRO, 2012), processo que pode ser alcançado pela propagação de eucalipto *in vitro*. E dentre as técnicas de propagação *in vitro*, os Sistemas de Imersão Temporária (*Temporary Immersion Systems – TISs*), também conhecidos como Biorreatores de Imersão Temporária (BITs), geralmente permitem maior propagação de plantas quando comparados com o sistema convencional de micropropagação em meio de cultura semi-sólido. Além disso, este sistema reduz custos de produção, não só pela automatização do processo, que irá reduzir a mão de obra (MENDONÇA et al., 2016), mas também pela economia em agente geleificante, espaço ocupado, entre outros (ETIENNE; BERTHOULY, 2002; MCALISTER et al., 2005).

Este tipo de biorreator por fazer uso de meio de cultura líquido, permite uma melhor absorção de nutrientes pelas plantas, aumentando a taxa de multiplicação de brotos e produzindo plantas mais uniformes (ETIENNE; BERTHOULY, 2002; GONZÁLEZ et al., 2011). Além disso, o contato apenas temporário das plantas com o meio proporciona melhores trocas gasosas e diminui a ocorrência de alterações morfofisiológicas, como a hiperhidricidade (GEORGIEV et al., 2014).

Além de um sistema que permite uma eficiente propagação das plantas transgênicas, é necessário também o estabelecimento de bancos de genes para que estas possam ser armazenadas de forma segura (HAO; CHENG; DENG, 2005), antes de serem analisadas e liberadas para produção comercial. Um método bem conhecido é o da cultura *in vitro* convencional, porém a manutenção prolongada das plantas é onerosa, exige trabalho intensivo, além do risco da ocorrência de variações somaclonais e possíveis contaminações (ENGELMANN, 1997; HAO; CHENG; DENG, 2005; PADAYACHEE et al., 2009; WANG et al., 2014). Desta forma, uma solução para preservação destas plantas é a utilização do método de criopreservação, no qual consiste no armazenamento de material genético em nitrogênio líquido por longo período de tempo, assegurando características juvenis e estabilidade genética de genótipos elite, enquanto ocorrem os ensaios de campo (CARNEROS et al., 2017; PADAYACHEE et al., 2009).

Dentre as técnicas de criopreservação, a *droplet-vitrification* tem sido aplicada nas mais variadas espécies, incluindo o eucalipto, batata, maçã, aspargos, oliveira, citrus (BRADAĬ et al., 2017; KAYA et al., 2013; SAKAI; ENGELMANN, 2007; VOLK et al., 2017). As principais vantagens desta técnica é o uso de folhas de alumínio e o pequeno volume de solução crioprotetora utilizado, os quais permitem uma alta taxa de congelamento e de aquecimento. Outro método de criopreservação desenvolvido recentemente, é o da crioplaca. Este método utiliza crioplacas de alumínio, que além de possuir as qualidades do método *droplet-vitrification*, apresentam o uso de alginato de sódio, que adere os explantes nas placas de alumínio e também os protege de uma possível toxidez química causada pelas soluções crioprotetoras (YAMAMOTO et al., 2011b).

Este método tem sido relatado com sucesso para algumas espécies incluindo crisântemo, morango, hortelã, cravo e caqui (MATSUMOTO et al., 2015; SEKIZAWA et. al., 2011; YAMAMOTO et. al., 2011a, 2011b, 2012).

Diante do exposto, os objetivos desta tese foram transformar o híbrido *Eucalyptus grandis x Eucalyptus urophylla*, avaliar três TISs na propagação de plantas deste mesmo híbrido, além de otimizar parâmetros para a sua criopreservação e comparar fontes de explantes com idades diferentes na criopreservação de *Eucalyptus grandis*.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 O gênero *Eucalyptus* e a indústria de celulose

O gênero *Eucalyptus*, pertencente à família Myrtaceae, é muito importante devido as suas várias aplicações industriais e os diversos serviços ambientais que suas florestas plantadas promovem, como por exemplo a regulação dos ciclos hidrológicos, o controle da erosão e da qualidade do solo, a conservação da biodiversidade e o fornecimento de oxigênio para o planeta (IBÁ, 2017). Por possuir grande adaptabilidade, inclusive em solos pobres, ele é plantado em várias regiões do mundo, como América do Sul, Ásia, Austrália e Europa, cobrindo uma área de aproximadamente 20 milhões de hectares em mais de 90 países ao redor do mundo (LACLAU, 2018; TORRE et al., 2014).

A relevância econômica deste gênero se deve ao seu rápido crescimento, ampla adaptabilidade e o multiuso de sua madeira, utilizada como matéria-prima para a produção de papel e celulose, fabricação de móveis, geração de energia, carvão vegetal e construção civil, além dos óleos essenciais, a partir dos quais são fabricados alimentos, cosméticos, remédios, entre outros produtos (BERTOLA, 2014). Além disso, o eucalipto possui baixo custo de produção, devido principalmente ao alto rendimento da polpa, alta produtividade florestal e qualidade de suas fibras (PRINSEN et al., 2012).

O rendimento médio de uma floresta de eucalipto no Brasil varia de 35 a 50 m<sup>3</sup>/ha/ano e, dependendo da região, podem-se obter valores ainda maiores, sendo estes dados expressivos quando comparados com seu país de origem, a Austrália, que apresenta um rendimento médio de, aproximadamente, 25 m<sup>3</sup>/ha/ano (PINTO et al., 2014).

Uma das vantagens conferidas ao eucalipto e, que possibilita esse grande desempenho em produção, é a facilidade de se obter cruzamentos entre diferentes espécies do mesmo gênero, processo chamado de hibridação. O *E. urograndis* é um dos híbridos de eucalipto mais conhecido e utilizado no setor florestal brasileiro. Esse cruzamento confere as melhores características do *E. grandis* (crescimento e qualidade da madeira) e do *E. urophylla* (adaptação à diferentes condições climáticas e resistência à doenças, particularmente ao fungo *Cryphonectria cubensis* causador do cancro do eucalipto (CIB, 2008).

No Brasil, os plantios de eucalipto ocupam uma área de 7,4 milhões de hectares, o que representa 75,2% da área total de árvores plantadas no país. Estes plantios são destinados à diversos segmentos industriais, sendo o que mais cresce no cenário atual o de celulose e

papel, contribuindo com uma fatia de 34,6% do total de árvores plantadas no Brasil (PEVS, 2017).

Para a indústria de celulose algumas características da madeira, como taxa de crescimento, volume de madeira e formato do tronco devem ser levadas em consideração. As árvores de eucalipto com maior taxa de crescimento possuem maior volume de madeira no momento do corte, o que leva a um incremento na quantidade de madeira seca por unidade de área, característica importante para a indústria de carvão e celulose. As árvores com aspecto retilíneo além de permitirem a obtenção de melhores postes, escoras e melhor madeira para a serraria, é também uma vantagem no empilhamento e manuseio das toras para lenha ou celulose (ELDRIDGE et al., 1993).

Outras características como a densidade básica da madeira e o teor de lignina também interferem na indústria de celulose (BISON, 2004). A densidade da madeira está diretamente relacionada com a espessura da parede celular e com o diâmetro das fibras desse composto, sendo que um incremento na densidade básica da madeira promove ganho na quantidade de celulose contida em um metro cúbico de madeira, o que proporciona economia nas operações de manuseio (ASSIS, 1996). Quanto à lignina, uma redução no teor deste componente implicará em benefícios na indústria de celulose para o processo de polpeamento e branqueamento, pois quanto maior o seu teor, maior a quantidade de produtos químicos será consumido e mais celulose será destruída devido a um ataque químico mais forte, o que acarretará na redução do rendimento deste composto (ASSIS, 1996).

A principal aplicação da celulose é na indústria de papel, representando mais de 95% do consumo global (BNDES, 2014). Para o processo de fabricação de papel o tipo de fibra de celulose utilizada determina o tipo de papel fabricado. De forma geral, papéis de imprimir e escrever, os papéis *tissue* e alguns tipos de papéis cartão são fabricados a partir de fibras curtas, que proporcionam maior opacidade e maciez. Já papéis para embalagem, papelão ondulado entre outros deste tipo são fabricados a partir de fibras longas, que proporcionam maior resistência mecânica. Existem também as chamadas pastas de alto rendimento, produzidas com rendimento na transformação madeira/pasta maior que 80%, utilizadas na produção de papel imprensa, papel sanitário e revistas (IBÁ, 2015).

Apesar de grande parte da celulose produzida ser destinada à produção de papel, uma pequena fração é destinada à celulose solúvel, que é usada para a fabricação de produtos como viscose, éteres, acetato de celulose, entre outros. A celulose solúvel é um tipo de polpa especial com alto teor de alfa-celulose, a qual confere maior pureza ao produto. Várias são as aplicações dos derivados da celulose solúvel: a fibra de viscose é predominantemente usada

na indústria têxtil. Os éteres possuem como principais consumidores as indústrias farmacêuticas (em cápsulas), alimentícias (em capa de embutidos) e de cosméticos. Já os acetatos são utilizados principalmente na indústria tabagista (BNDES, 2014).

Mais recentemente a celulose também tem sido usada como uma fonte renovável de biocombustível (MEENTS; WATANABE; SAMUELS, 2018).

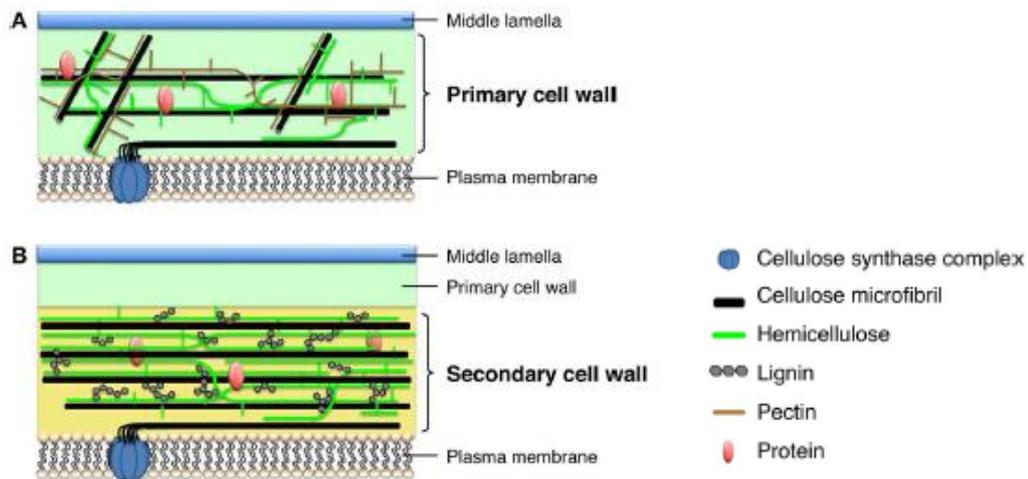
## **2.2 Local de ocorrência e biossíntese da celulose**

A celulose é um polissacarídeo hidrofóbico, formado por unidades de glicose unidas por ligações  $\beta$ -1,4 (BURTON et al., 2005; SOMERVILLE et al., 2004). Nos vegetais este polissacarídeo ocorre na parede celular, que é composta de três camadas principais: parede primária, parede secundária e lamela média. Esta composição varia de acordo com o tipo celular e a idade da planta, principalmente no quesito presença ou ausência da parede celular secundária.

A parede celular primária começa a se formar durante a divisão celular e é reforçada durante o crescimento celular (SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ et al., 2010, TAIZ; ZEIGER, 2013). Células em crescimento, de parênquima, células fotossintetizantes presentes nas folhas e alguns outros tipos celulares, possuem somente parede celular primária. Esta é caracterizada por ser delgada (em torno de 1 a 3  $\mu$ m, constituída de 9 a 25% de celulose, possuindo também hemicelulose, pectina e proteínas glicolisadas (FIGURA 1A) (ENDLER; PERSSON, 2011; RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001; SALISBURY; ROSS, 1991).

Ao cessar o crescimento celular, a parede celular secundária é depositada no lado interior da parede primária em alguns tipos celulares, tais como as fibras e elementos traqueários, como os tecidos de xilema e os traqueídeos (TURNER; GALLOIS; BROWN, 2007). A sua composição compreende até 60% de celulose, além de ser composta também por hemicelulose e lignina. A estrutura das microfibrilas de celulose diferem entre a parede celular primária e secundária, sendo que uma maior cristalinidade e grau de polimerização na parede celular secundária influenciam na sua força e rigidez (FIGURA 1B) (MCNEIL et al., 1984; MEENTS; WATANABE; SAMUELS, 2018).

Figura 1 – Composição da parede celular. A – Parede primária; B – Parede secundária.

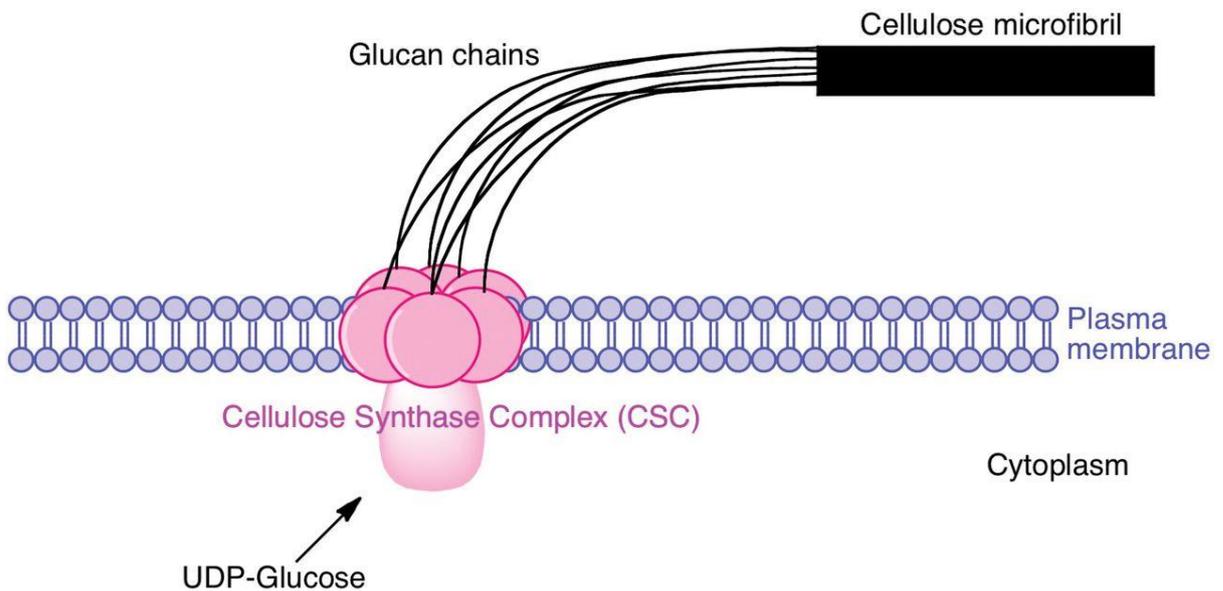


Fonte: Nakano et al. (2015).

A cadeia de monômeros de glicose, unidos por ligações  $\beta$ -(1-4) na celulose, é chamada de glucano. A interação das cadeias de glucanos, através de pontes de hidrogênio e forças de Van der Waals, formam as chamadas microfibrilas de celulose. (DELMER; AMOR, 1995; KIM et al., 2013; TAIZ; ZEIGER, 2013).

A síntese de celulose ocorre por proteínas denominadas CesA, que são localizadas na membrana celular em uma estrutura na forma de uma roseta hexagonal, conhecida como Complexo Celulose Sintase (CCS) (FIGURA 2), em que a região catalítica está voltada para o citoplasma (BOWLING; BROWN, 2008; MCFARLANE; DÖRING, 2014). Acreditava-se que esse complexo era formado por 12-36 proteínas CesA, o que era baseado na largura das microfibrilas de celulose (MCFARLANE; DÖRING, 2014). No entanto, recentes estudos utilizando técnicas analíticas melhoradas e modelos computacionais tem demonstrado que provavelmente o CCS é composto de 18-24 proteínas CesA, desta forma o modelo do complexo celulose sintase é um hexâmero de trímeros ou tetrâmeros de proteínas CesA, que produzem de 18-24 cadeias de glucanos e se unem para a formação de microfibrilas (MEENTS; WATANABE; SAMUELS, 2018).

Figura 2 – Formação das microfibrilas de celulose através do Complexo Celulose Sintase (CCS).



Fonte: Wightman e Turner (2010).

O CCS catalisa a transferência de glicose para a cadeia de glucano crescente, utilizando como substrato uridinadifosfato-glicose (UDP-glicose). A subunidade catalítica do complexo Cesa se liga ao substrato UDP-glicose e os adiciona à cadeia de celulose nascente que é liberada no espaço extracitoplasmático. É suposto que cada proteína Cesa produz uma única cadeia de glucanos que se une à cadeia adjacente na roseta, formando uma microfibrila (BROWN JR.; SAXENA, 2000; GARDINER; TAYLOR; TURNER, 2003; MORGAN; STRUMILLO; ZIMMER, 2013).

### 2.3 Transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens*

A transformação genética permite a introdução controlada de genes exógenos no genoma nuclear de um organismo receptor de forma herdável e estável (DIOUF, 2003), inserindo caracteres de interesse econômico que possibilitam, por exemplo, aumento da produtividade, resistência à estresses bióticos e abióticos e uma melhor qualidade da madeira (GONZÁLEZ, 2002).

Dois métodos são utilizados para a transformação genética, sendo eles o método direto e o método indireto. Dentre os métodos diretos, ressalta-se o da biobalística, em que o tecido alvo é bombardeado com micropartículas de ouro ou tungstênio coberta com o plasmídeo contendo o gene de interesse. As micropartículas aceleradas com ar comprimido (hélio), onda

de choque elétrico ou pólvora são disparadas em direção ao tecido-alvo, penetrando a parede celular e transferindo o DNA exógeno para o interior das células (CARRER; BARBOSA; RAMIRO, 2010; MATEUS; SILVA, 2013).

No método indireto, a transferência de genes ocorre por meio de bactérias do gênero *Agrobacterium*. A *Agrobacterium tumefaciens* é uma bactéria gram-negativa do solo, naturalmente patogênica, que causa uma doença denominada “galha da coroa”, a qual na natureza promove a formação de tumores nas zonas de infecção em várias espécies de plantas dicotiledôneas. Durante a infecção o T-DNA (“transfer DNA”), um segmento móvel do plasmídeo Ti (*Tumor-inducing*), é transferido para o núcleo da célula da planta e integrado no seu genoma (WADL, 2005). Dentre os genes do T-DNA, estão presentes os oncogenes que são os responsáveis pela patogenicidade da bactéria. Para o processo de transformação, os oncogenes são excluídos do T-DNA, obtendo-se uma linhagem desarmada e o DNA de interesse é inserido nas extremidades da região-T (SARTORETTO et al., 2008).

A vantagem da *A. tumefaciens* como vetor de transferência genética é que ela proporciona geralmente padrões simples de integração (ANDRADE, 2001). Enquanto os métodos diretos de transformação genética, geralmente resultam na integração de múltiplas cópias, o que pode gerar silenciamento e instabilidade da expressão do gene (VERGUNST; HOOYKAAS, 1999 *apud* GONZÁLEZ, 2002).

Muitos estudos relataram o sucesso da transformação genética no gênero *Eucalyptus* por meio da *A. tumefaciens* e alguns deles tinham o propósito de modificação e biossíntese de celulose, aumento da biomassa e modificação do conteúdo de lignina (AGGARWAL; KUMAR; REDDY, 2015; HUSSEY et al., 2011; QUANG et al., 2012; SHINYA et al., 2014; TIAN et al., 2013; TORRE et al., 2014).

## 2.4 Genes Cesa

Os genes responsáveis pela codificação das proteínas Cesa do CCS em diversos organismos são conhecidos como genes *Cesa* (DOBLIN et al., 2002).

Segundo Meents; Watanabe; Samuels (2018), o número de genes *Cesa* variam entre as espécies de plantas, que possuem diferentes conjuntos de proteínas Cesa requeridas para a síntese de celulose na parede primária e secundária. Em *Arabidopsis*, por exemplo, *AtCesa1*, *AtCesa3* e um dos *AtCesa2/5/6/9* estão envolvidos na síntese de celulose depositada na parede primária (DOBLIN et al., 2002), enquanto *AtCesa4*, *AtCesa7* e *AtCesa8* são essenciais para a síntese de celulose na parede secundária (PERSSON et al., 2005).

A função dos três genes *CesA* envolvidos na síntese de celulose na parede celular secundária (*CesA4*, *CesA7* e *CesA8*), foi desvendada através de seus mutantes. Mutações nestes genes, descritas como *irx5*, *irx3* e *irx1*, respectivamente, causam diminuição na quantidade total de celulose nas paredes celulares secundárias. Essa mutação *irx* (*irregular xylem* - xilema irregular) é caracterizada por um colapso nos vasos de xilema, que ocorre pela falta de celulose e leva à uma menor resistência à pressão exercida durante o transporte de água. Isso ocorre, porque a formação de parede celular é anormal e o caule em formação é muito fraco (TAYLOR et al., 1999).

Esses três genes, dando destaque ao *AtCesA8* (ortólogo do *OsCesA4* em arroz - gene de interesse do presente trabalho), são responsáveis pela codificação de diferentes subunidades catalíticas do CCS e todos são essenciais para a formação da celulose na parede celular secundária de uma mesma célula, visto que todas as subunidades são importantes durante o processo de montagem do complexo (TAYLOR et al., 2003).

Cada complexo contém uma mistura de ao menos 3 tipos de proteínas *CesA*. Em experimentos de co-imunoprecipitação (CoIP) foi demonstrado que quando um dos três tipos de *CesA* é perdido, o complexo não é mais detectado e os outros dois tipos de *CesA* não interagem e são acumulados em níveis baixos quando comparados com o tipo selvagem (MEENTS; WATANABE; SAMUELS, 2018).

Taylor et al. (2003) observaram que mutantes nulos de genes *CesA* na parede celular secundária, ainda foram capazes de produzir celulose, apesar da cristalinidade alterada e a baixa abundância deste polímero. Isso pode ser compreendido por estudos como o de Carroll et al. (2012), o qual mostra a complementação parcial de um mutante *cesa8* na parede celular secundária por um *CesA1* da parede celular primária, e de um mutante *cesa3* da parede celular primária por um *CesA7* da secundária. De acordo com Arioli et al. (1998), também é possível que as proteínas *CesAs* remanescentes possam formar CCSs aberrantes, que irão produzir celulose de baixa qualidade.

Apesar de todos esses genes serem expressos em uma mesma célula, uma mutação em apenas um deles é suficiente para reduzir consideravelmente a quantidade de celulose depositada nas paredes celulares secundárias (ZHONG et al., 2003).

## 2.5 Micropropagação em Sistemas de Imersão Temporária (TISs)

Sistemas que utilizam meio líquido na propagação *in vitro* de plantas são considerados uma alternativa mais efetiva que o método convencional (meio semi-sólido), porque nestes

sistemas as plantas têm maior acesso aos componentes do meio, o que permite a absorção de nutrientes por toda sua superfície, levando à maiores ganhos em biomassa, produção de plantas mais uniformes e redução no tempo de propagação. Além disso, estes sistemas possuem facilidade de manuseio, possibilidade de um determinado nível de automatização, economizando mão-de-obra, e também não utilizam agentes geleificantes no meio (ETIENNE; BERTHOULY, 2002; GONZÁLEZ et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2011a, 2011b; WELANDER et al., 2014).

O Sistema de Imersão Temporária (TIS), também conhecido como Biorreator de Imersão Temporária (BIT) é um equipamento que utiliza meio líquido para micropropagação clonal sob imersão temporária de células, tecidos ou órgãos, tendo como objetivo final a produção de mudas em larga escala (TEIXEIRA, 2002). O princípio deste sistema se baseia na imersão dos explantes em meio de cultura líquido por intervalos curtos e em intervalos regulares. Este sistema possui inúmeras vantagens como: 1) evita a imersão contínua dos explantes no meio de cultura, na qual pode afetar negativamente no crescimento e morfogênese das plantas, produzindo brotos com sintomas hiperhídricos, por exemplo, 2) permite a diluição de compostos fenólicos, evitando a oxidação dos tecidos, 3) fornece adequada transferência de oxigênio para as plantas, 4) reduz problemas com contaminação, devido a redução de mão de obra 5) facilita a renovação do meio, 6) permite a autoclavagem dos recipientes, 7) são sistemas de baixo custo, 8) possuem recipientes maiores que economizam no tempo de transferência das plantas, entre outras (ETIENNE; BERTHOULY, 2002; REGUEIRA et al., 2018).

A redução dos custos em TISs quando comparados com o meio semi-sólido é um grande atrativo para a produção em larga escala. Essa redução se deve a vários fatores, como: 1) redução do número de frascos, 2) redução do número de prateleiras, 3) redução de mão de obra para a manipulação do material, e conseqüentemente, 4) redução de contaminação do material (ESCALONA et al., 1999; ETIENNE; BERTHOULY, 2002). Lorenzo et al. (1998), por exemplo, verificaram uma redução de custos de cerca de 46% ao utilizar TISs na propagação de brotações de *Saccharum* spp. em relação ao meio semi-sólido, atribuindo isso à redução de mão de obra e espaço requerido para a propagação. Escalona et al. (1999) observaram uma redução de 20% nos custos de produção por planta de abacaxi cultivadas em TISs em comparação com o método convencional.

Embora muitas sejam as vantagens apresentadas por este sistema, um dos desafios associados ao cultivo em biorreatores é a hiperhidricidade, desordem fisiológica relacionada com o acúmulo anormal de água no interior das células e tecidos, que deixam as plantas com

aspecto vítreo e transparente e com folhas e caule quebradiços (LE ROUX; VAN STADEN, 1991; VASCONCELOS et al., 2012). No entanto, alguns trabalhos têm demonstrado soluções para reduzir ou até mesmo eliminar este problema por meio de procedimentos como, ajuste da frequência e tempo de imersão, aplicação de ar extra dentro do sistema e redução da concentração de citocinina no meio de cultivo (AKDEMIR et al., 2014; CHAKRABARTY et al., 2003; GONZÁLEZ et al., 2011; QUIALA et al., 2012).

Muitos trabalhos com espécies de eucalipto mostraram resultados promissores na micropropagação em TISs. O híbrido *E. grandis X E. urophylla* apresentou uma taxa de multiplicação 5,75 vezes maior em TIS do que em meio semi-sólido (BUSINGE et al., 2017). Hajari et al. (2006), ao utilizarem o biorreator RITA<sup>®</sup> na propagação de diferentes espécies de eucalipto observaram uma taxa de multiplicação até 1,58 vezes maior em TIS do que em meio semi-sólido. Além destes, trabalhos com *E. grandis X E. urophylla* (OLIVEIRA et al., 2011a, 2011b e 2014), *E. globulus* (GONZÁLEZ et al., 2011) e *E. camaldulensis* (MENDONÇA et al., 2016), também apresentaram resultados promissores em TISs.

Um número cada vez maior de biorreatores vem surgindo no mercado, com o objetivo de aprimorar os aspectos ligados ao seu funcionamento e manuseio, produzindo um número cada vez maior de plantas em um espaço reduzido de tempo, além de prezar por plantas de qualidade e menor custo de produção. Dentre estes sistemas, podemos destacar três: SETIS<sup>TM1</sup>, *Plantform*<sup>TM2</sup> e ElecTIS<sup>3</sup>.

O biorreator SETIS<sup>TM</sup> (FIGURA 3) se baseia no princípio de frascos gêmeos conectados entre si (sendo um frasco para o meio de cultura e o outro para os explantes). Este sistema permite a propagação massiva de plantas, por possuir um grande frasco para a multiplicação dos explantes (6 L). O funcionamento deste sistema ocorre da seguinte maneira: o ar comprimido é fornecido para o frasco contendo o meio de cultura, fazendo com que o meio seja transferido para o frasco contendo os explantes (o qual está localizado sobre o frasco do meio de cultura) e assim, os explantes permanecem por um determinado período de tempo em contato com este meio. Depois disso, o meio é drenado para o seu frasco por meio da força de gravidade. Para que ocorra as trocas gasosas, o ar comprimido é fornecido para o frasco dos explantes a fim de renovar o ambiente gasoso interno.

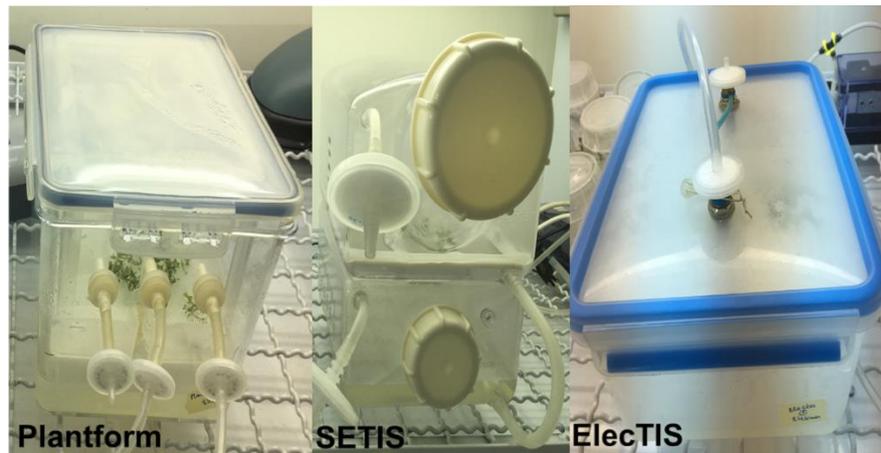
---

<sup>1</sup> Disponível em: <setis-systems.be>. Acesso em: 11 jan. de 2019

<sup>2</sup> Disponível em: < www.plantform.se>. Acesso em: 11 jan. 2019.

<sup>3</sup> Disponível em: < www.explanta.com/bioreactor-electis>. Acesso em: 11 jan. 2019.

Figura 3 – Sistemas de Imersão Temporária (TISs).



Fonte: Preparada pela autora.

Embora poucos sejam os trabalhos na literatura que utilizaram este sistema na propagação de plantas, resultados promissores foram encontrados, como é o caso de cana-de-açúcar, em que o biorreator SETIS<sup>TM</sup> apresentou um maior número de brotos por explante (41,0) quando comparadas com outros tipos de TISs (RITA<sup>®</sup> - Recipient for Automated Temporary Immersion, TIB<sup>TM</sup> - Temporary Immersion Bioreactor e GIB - Gravity Immersion Bioreactor) (BELLO-BELLO; MENDOZA-MEXICANO; PÉREZ-SATO, 2018).

O biorreator *Plantform*<sup>TM</sup> (FIGURA 3) é composto de apenas um recipiente, o qual serve tanto para o meio de cultura como para os explantes. Ele funciona por meio da entrada de ar por uma das extremidades do sistema, que impulsiona a subida do meio de cultura até uma cesta onde estão dispostos os explantes, submergindo-os por um tempo determinado. Este sistema conta com um fornecimento de ar extra que assim como o período de imersão também pode ser controlado e, além disso, seus recipientes podem ser dispostos um sobre o outro, economizando espaço e sendo um atrativo para produção em larga escala (WELANDER et al., 2014).

Os explantes cultivados neste biorreator apresentaram maiores taxas de multiplicação, maior comprimento de brotos e maior taxa de enraizamento na maioria dos clones de *Castanea sativa* testados, quando comparados com o biorreator RITA<sup>®</sup>. Segundo os autores, isto pode ser explicado pela maior capacidade do *Plantform*<sup>TM</sup> para o meio de cultura quando comparado com o biorreator RITA<sup>®</sup>, maior superfície para a disposição dos explantes, além da aeração adicional que pode ser aplicada neste tipo de sistema (VIDAL; BLANCO; CUENCA, 2015; WELANDER et al., 2014). Já Sacco et al. (2015) ao compararem o desempenho do *Plantform*<sup>TM</sup> e de RITA<sup>®</sup> na micropropagação de *Stevia rebaudiana*, não observaram diferença estatística na taxa de multiplicação entre os dois biorreatores na

frequência de imersão a cada 3 h/3 min. E apesar de observaram a produção de brotos com melhor qualidade (sem hiperhidricidade) em biorreator RITA<sup>®</sup>, os brotos produzidos em *Plantform*<sup>™</sup> apresentaram maior porcentagem de enraizamento e o problema de hiperhidricidade foi eliminado com uma frequência de imersão a cada 8 h/3 min.

Já os biorreatores ElecTIS (FIGURA 3), desenvolvidos recentemente pela empresa italiana Explanta e até então nunca testado, foi pela primeira vez utilizado neste trabalho. Este sistema é inovador quanto ao seu funcionamento interno, já que a imersão dos explantes pelo meio de cultura não ocorre por meio da emissão forçada de ar do ambiente externo, como nos demais biorreatores, mas sim por meio de um sistema pneumático que muda a posição dos explantes dentro do recipiente, de modo temporário. Segundo os criadores do sistema, ele apresenta as seguintes vantagens: 1) simplificação das operações de preparo, esterilização e manuseio do equipamento; 2) eliminação de risco de contaminação que ocorre devido a ligação com meio externo; 3) trocas gasosas interna ao recipiente; 4) melhora das taxas de multiplicação; 5) ausência de alterações morfofisiológicas, tais como hiperhidricidade e necrose de ápices e 6) melhoramento do estado nutricional e vegetativo das plantas levando à um maior rendimento na fase de aclimatização e crescimento das plantas. Este sistema, assim como o *Plantform*<sup>™</sup> é composto por um único recipiente, que possui uma cesta onde os explantes são dispostos. Ao ser acionado o sistema pneumático, a cesta com os explantes, que se encontra suspensa, é movida até o fundo do recipiente onde está o meio de cultura, fazendo com que as plantas permaneçam em contato com o meio por um determinado período de tempo.

Apesar de ainda não haver trabalhos publicados com o biorreator ElecTIS, este sistema foi apresentado no *III Convegno Nazionale sulla Micropropagazione (VitroSOI 2017)*, em Pescia, na Itália e alguns resultados promissores foram mostrados com *Paulownia*, *Crisântemo* e *Nandina domestica* (LAMBARDI, 2017).

## 2.6 Criopreservação

A criopreservação é uma técnica de conservação *in vitro*, a qual mantém o material biológico à uma temperatura ultrabaixa em nitrogênio líquido (-196°C) ou em sua fase de vapor (-150°C) (KULUS; ZALEWSKA, 2014). Em tais temperaturas a atividade metabólica é efetivamente interrompida, o que permite o armazenamento do material por um longo período de tempo (ENGELMANN, 2004; KULUS; ZALEWSKA, 2014; PADAYACHEE et al., 2009).

Esta técnica é vista como uma estratégia para complementar outros métodos de manutenção existentes, servindo como uma forma de *backup* de uma ampla base genética para fins de reprodução, além de assegurar características juvenis e estabilidade genética de genótipos elite, enquanto ensaios de campo ocorrem e também por ser útil na manutenção de espécies em risco de extinção (CARNEROS et al., 2017; LI et al., 2018; PADAYACHEE et al., 2009).

A técnica de criopreservação oferece inúmeras vantagens, tais como: mínima manutenção do material armazenado, redução de custos e de mão-de-obra, diminui riscos de variações somaclonais, evita possíveis contaminações e o material pode ser estocado em pequenos volumes (AHN; CHOI, 2017; ENGELMANN, 1992; NAIRN, 1993; PUKACKI; JUSZCZYK, 2015).

Apesar das vantagens apresentadas por esta técnica, ela também possui alguns desafios. Sendo que o mais importante deles é evitar a formação de cristais de gelo decorrentes da exposição da água celular à temperaturas de congelamento. Este tipo de evento pode causar danos celulares irreversíveis, tal como a ruptura da membrana celular (DUMET et al., 1994; PADAYACHEE et al., 2009).

Para evitar tais danos é necessário a desidratação celular antes da exposição do material ao nitrogênio líquido. A desidratação celular pode ocorrer por meio das técnicas de criopreservação clássicas ou novas. Nas técnicas clássicas, também conhecida como *slow cooling* ou *two step cooling*, a desidratação é induzida pelo congelamento, que geralmente ocorre à uma taxa de 0,1 a 1°C/min até uma temperatura de pré-congelamento por volta de -40°C. A taxa de resfriamento não pode ser muito rápida para permitir a desidratação suficiente do material e nem lenta demais, porque isso pode levar à uma desidratação muito forte, tendo como consequência a morte celular. Esta técnica é usada principalmente para espécies com tecidos indiferenciados ou ápices de espécies tolerantes ao frio (ENGELMANN, 2004).

A diminuição de temperatura no processo de *slow cooling* causa um super resfriamento do meio extracelular, seguido da formação de gelo. A membrana celular funciona como uma barreira física que impede o gelo de penetrar no interior das células, permanecendo o interior super resfriado, mas não congelado. Desta forma, para que ocorra o equilíbrio entre o meio interno e externo, as células perdem água para o meio externo causando assim a desidratação celular (ENGELMANN, 2004; TOWILL, 2002).

Apesar de ser uma técnica simples, a técnica de *slow cooling* apresenta desvantagens como a necessidade de aparato de congelamento especial e é limitada quanto ao tipo de

explante, não podendo ser usada para tecidos diferenciados de espécies tropicais e suscetíveis ao frio (KULUS; ZALEWSKA, 2014). Desta forma, novas técnicas de criopreservação surgiram para contornar tais problemas.

As técnicas novas de criopreservação são baseadas na vitrificação e podem ser empregadas para uma ampla gama de explantes, além de ser mais fácil de executar e mais reprodutível que a técnica clássica (PANIS; LAMBARDI, 2005). Nesta técnica, a desidratação é realizada antes do congelamento, por meio da exposição dos explantes à soluções crioprotetoras altamente concentradas e/ou dessecação pelo ar (ENGELMANN, 2004; REED et al., 2006).

A vitrificação é a transição da água do seu estado líquido para um estado vítreo amorfo, ou seja, a solidificação não cristalina da água, evitando assim a formação de cristais de gelo (ENGELMANN, 2004; PANIS; LAMBARDI, 2005). Um protocolo típico baseado na vitrificação consiste dos seguintes passos: pré-cultivo do material, encapsulamento e/ou tratamento com LS (*Loading Solution* – mistura de crioprotetores tóxicos diluídos, que visa aumentar a resistência do material aos crioprotetores mais concentrados), tratamento com PVS (*Plant Vitrification Solution* – mistura de crioprotetores de alta concentração) ou solução de sacarose e a rápida imersão em nitrogênio líquido. Depois do nitrogênio, ocorre o descongelamento e lavagem do material com a WS (*Washing Solution*) para retirada dos crioprotetores e inoculação no meio de recuperação (KULUS; ZALEWSKA, 2014).

O passo de pré-cultivo tem possibilitado aumentar a viabilidade do material de muitas espécies vegetais após a criopreservação. Isto porque ele é capaz de desencadear o acúmulo de vários compostos com propriedades crioprotetoras (açúcares, ácido abscísico, prolina e betaína), os quais aumentam a tolerância das plantas à estresses como a seca e o frio (PADAYACHEE et al., 2009; KULUS; ZALEWSKA, 2014).

Na criopreservação de eucalipto o pré-cultivo é um passo muito importante, visto que este gênero apresenta alta sensibilidade à dessecação (PADAYACHEE et al., 2009), sendo essencial o uso de métodos eficazes na desidratação celular sem causar danos aos tecidos a serem criopreservados.

Em relação aos crioprotetores, estes podem ser de dois tipos: não-penetrantes (sacarose e outros carboidratos) e penetrantes (DMSO – dimetilsulfóxido, EG – etilenoglicol e glicerol). O DMSO e o EG possuem rápida permeabilidade, formando um estado vítreo e bloqueando a formação de gelo. Já o glicerol é menos penetrante, devido sua alta viscosidade e alto peso molecular (KIM et al., 2009).

Vários são os crioprotetores utilizados nos protocolos de criopreservação, entre eles estão PVS1, PVS2, PVS3, PVS4 e VSL (*Vitrification Solution L*). O mais utilizado é o PVS2, que consiste em 30% (p/v) de glicerol, 15% (p/v) de etilenoglicol, 15% de DMSO (p/v) e 0,4 M de sacarose [13,7% (p/v)] em meio MS (SAKAI; KOBAYASHI; OIYAMA, 1990). Segundo Gámez-Pastrana; González-Arno e Martínez-Ocampo (2011), o PVS2 foi mais eficaz na remoção de água congelável da célula, quando comparado com outros crioprotetores. Além do tipo de crioprotetor utilizado, também é muito importante levar em consideração o tempo que os explantes ficam expostos à ele (KULUS; ZALEWSKA, 2014). Este tempo pode variar entre 15 e 25 min (TAKAGI et al., 1997; THINH; TAKAGI, 2002) e 1 e 2 h no caso de protocormos de orquídeas (ANTONY et al., 2011, BUKHOV et al., 2006). Além disso, o tipo de explante utilizado, a espécie estudada e o genótipo utilizado podem determinar o tempo de exposição ao crioprotetor.

O método criogênico utilizado também pode ter grande influência nos resultados finais da criopreservação. Um método bastante utilizado e que têm apresentado excelentes resultados para diversas espécies é a *droplet-vitrification*. Este método teve origem a partir da idéia em utilizar folhas de alumínio durante o processo de criopreservação (KARTHA et al., 1982) e apresenta algumas vantagens, como por exemplo, as folhas de alumínio permitem alta condutividade de calor, o que leva os explantes à atingirem taxas de congelamento e aquecimento muito elevadas, evitando a formação de cristais de gelo (KULUS; ZALEWSKA, 2014). Além disso, uma pequena quantidade de crioprotetor é utilizada, o que também contribui para o rápido congelamento e aquecimento (SAKAI; ENGELMANN, 2007).

Outras vantagens deste método são a rápida transferência dos ápices para dentro e fora do nitrogênio e também a menor manipulação dos explantes, evitando assim riscos de lesões aos tecidos criopreservados (KACZMARCZYK et al., 2011; KULUS; ZALEWSKA, 2014).

Um outro método criogênico recentemente desenvolvido pelo Instituto Nacional de Ciências Agrobiológicas (NIAS) Genebank (Tsukuba, Japão) (VUJOVIĆ et al., 2015) e que também tem demonstrado resultados promissores é o método da crioplaca. Este método utiliza placas criogênicas de alumínio durante o processo da criopreservação. Ele surgiu com o intuito de aprimorar a metodologia da *droplet-vitrification*, técnica que apesar das inúmeras vantagens apresentadas, exige um alto nível de habilidade do executor (KULUS; ZALEWSKA 2014).

No método da crioplaca os explantes são dispostos em pequenos poços nas placas de alumínio, onde são fixados por meio do seu encapsulamento em alginato de sódio. O alginato além de fixar os explantes nas placas de alumínio, tem função de proteção, visto que como ele

evita o contato direto do explante com as soluções crioprotetoras, pode ocorrer a atenuação do efeito tóxico destas soluções (YAMAMOTO et al., 2011b). Neste método, a desidratação pode ocorrer de duas formas, por meio de uma solução de vitrificação (desidratação osmótica), denominada de V-crioplaca, ou por meio da desidratação em fluxo laminar (desidratação física), a chamada D-crioplaca (NIINO et al., 2014).

Outro fator que tem grande influência na recuperação após a criopreservação é a idade da planta que fornece o explante a ser criopreservado. O material a ser criopreservado deve ser o mais jovem possível, pois de acordo com Kulus e Zalewska (2014), as células deste tipo de material são mais tolerantes ao congelamento.

Para Uchendu e Reed (2008), a recuperação das plantas após a criopreservação, depende de muitos fatores, incluindo idade da planta mãe, pré-tratamentos, comprimento e tipo de aclimatização ao frio, método criogênico utilizado e processo de recuperação.

## REFERÊNCIAS

- AGGARWAL, D.; KUMAR, A.; REDDY, M. S. Shoot organogenesis in elite clones of *Eucalyptus tereticornis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Nova Iorque, v. 152, p. 45-52, 2010.
- AGGARWAL, D.; KUMAR, A.; REDDY, M. S. Genetic transformation of endo-1,4-b-glucanase (Korrigan) for cellulose enhancement in *Eucalyptus tereticornis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Nova Iorque, v. 122, p. 363-371, 2015.
- AHN, C-H; CHOI, Y-E. In vitro clonal propagation and stable cryopreservation system for *Platycladus orientalis* via somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Nova Iorque, v. 131, p. 513–523, 2017.
- AKDEMIR, H. et al. Micropropagation of the pistachio and its rootstocks by temporary immersion system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Nova Iorque, v. 117, p. 65-76, 2014.
- ANDRADE, A. **Avaliação de parâmetros que influenciam a transformação genética de *E. grandis* via *Agrobacterium***. 2001. 123 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2001.
- ANTONY, J. J. J. et al. Effect of preculture and PVS2 incubation conditions followed by histological analysis in the cryopreserved PLBs of *Dendrobium* Bobby Messina orchid. **Australian Journal of Crop Science**, Brisbane, v. 5, n. 12, p. 1557–1564, 2011.
- ARIOLI, T. et al. Molecular analysis of cellulose biosynthesis in Arabidopsis. **Science**, Riverside, v. 279, p. 717–720, 1998.
- ASSIS, T. F. de. Melhoramento genético do eucalipto. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 18, n. 185, p. 32-51, 1996.
- BELLO-BELLO, J. J.; MENDOZA-MEXICANO, M.; PÉREZ-SATO, J. A. In vitro propagation of sugarcane for certified seed production. In: OLIVEIRA, A. de. (Org.). **Sugarcane - Technology and Research**. Londres: Intechopen, 2018. p. 101-112.
- BERTOLA, A. “**Eucalipto: Verdades e Mentiras**”. 2014. Disponível em: <<http://www.painelflorestal.com.br/noticias/voce-e-a-floresta/as-verdades-e-as-mentiras-que-dizem-sobre-o-eucalipto>> Acesso em: 19 fev. 2016.
- BISON, O. **Melhoramento de eucalipto visando à obtenção de clones para a indústria de Celulose**. 2004. 169 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.
- BNDES. **Potencial de diversificação da indústria química brasileira Relatório 4 – Derivados de celulose**. 2014. Disponível em: <[www.bndes.gov.br/SiteBNDES/export/sites/default/bndes\\_pt/Galerias/Arquivos/produtos/download/aep\\_fep/chamada\\_publica\\_FEPprosp ec0311\\_Quimicos\\_Relat4\\_celulose.pdf](http://www.bndes.gov.br/SiteBNDES/export/sites/default/bndes_pt/Galerias/Arquivos/produtos/download/aep_fep/chamada_publica_FEPprosp ec0311_Quimicos_Relat4_celulose.pdf)> Acesso em: 02 out. 2018.

BOWLING, A. J.; BROWN, R. M., JR. The cytoplasmic domain of the cellulose-synthesizing complex in vascular plants. **Protoplasma**, Berlim, v. 233, p. 115–127, 2008.

BRADAĚ, F.; ALMAGRO-BASTANTE, J.; SÁNCHEZ-ROMERO, C. Cryopreservation of olive somatic embryos using the droplet-vitrification method: The importance of explant culture conditions. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 218, p. 14-22, 2017.

BROWN Jr., R. M.; SAXENA, I. M. Cellulose biosynthesis: A model for understanding the assembly complex biopolymers. **Plant Physiology Biochemistry**, Amsterdam, v. 38, n. 1-2, p. 57-67, 2000.

BUKHOV, N. G.; POPOVA, E. V.; POPOV, A. S. Photochemical activities of two photosystems in *Bratonia* orchid protocorms cryopreserved by vitrification method. **Russian Journal of Plant Physiology**, Berlim, v. 53, n. 6, p. 793–799, 2006.

BURTON, R. A. et al. Plant cell wall polysaccharide biosynthesis: real progress in the identification of participating genes. **Planta**, Berlim, v. 221, p. 309-312, 2005.

BUSINGE, E. et al. Evaluation of a New Temporary Immersion Bioreactor System for Micropropagation of Cultivars of Eucalyptus, Birch and Fir. **Forests**, Basileia, v. 8, n. 196, p. 1-9, 2017.

CARNEROS, E. et al. Effect of different cryoprotectant procedures on the recovery and maturation ability of cryopreserved *Pinus pinea* embryogenic lines of different ages. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, Berlim, v. 53, p. 469–477, 2017.

CARRER, H.; BARBOSA, A. L.; RAMIRO, D. A. Biotecnologia na Agricultura. In: BRITTO, L. R. G. de. **Estudos Avançados**. São Paulo, 2010. p. 149-164.

CARROLL, A. et al. Complexes with mixed primary and secondary cellulose synthases are functional in *Arabidopsis* plants. **Plant Physiology**, Amsterdam, v. 160, p. 726-737, 2012.

CIB. Guia do eucalipto: oportunidades para um desenvolvimento sustentável. Disponível em: < [http://cib.org.br/wp-content/uploads/2011/10/Guia\\_do\\_Eucalipto\\_junho\\_2008.pdf](http://cib.org.br/wp-content/uploads/2011/10/Guia_do_Eucalipto_junho_2008.pdf) > Acesso em: 12 set. 2018.

CHAKRABARTY, D. et al. Micropropagation of apple rootstock M.9 EMLA using bioreactor. **Horticultural, Science and Biotechnology**, Oxford, v. 78, n. 5, p. 605-609, 2003.

DELMER, D. P.; AMOR, Y. Cellulose Biosynthesis. **The Plant Cell**, Rockville, v. 7, p.987-1000, 1995.

DIOUF, D. Genetic transformation of forest trees. **African Journal of Biotechnology**, Lagos, v. 2, n. 10, p. 328-333, 2003.

DOBLIN, M. S. et al. Cellulose biosynthesis in Plants: from genes to rosettes. **Plant Cell Physiology**, Oxford, v. 43, n.12, p. 1407-1420, 2002.

- DUMET, D. et al. Effect of various sugars and polyols on the tolerance to desiccation and freezing of oil palm polyembryonic cultures. **Seed Science Research**, Cambridge, v. 4, n. 3, p. 307 – 313, 1994.
- ELDRIDGE, K. et al. **Eucalypt domestication and breeding**. New York: Oxford University Press, 1993. 288 p.
- ENDLER, A.; PERSSON, S. Cellulose synthases and synthesis in *Arabidopsis*. **Molecular Plant**, Amsterdam, v. 4, p.199–211, 2011.
- ENGELMANN, F. Effects of freezing in liquid nitrogen on the properties of a soybean (*Glycine max* L. var. acme) callus strain used as a bioassay for cytokinin activity. **Cryo letters**, Lewes, v. 13, p. 331–336, 1992.
- ENGELMANN, F. In vitro conservation methods. In: CALLOW, J. A.; FORD-LLOYD, B. V.; NEWBURY, H. J. **Biotechnology and plant genetic resources**. Wallingford: CAB International, 1997. cap. 6, p 119-162.
- ENGELMANN, F. Cryopreservation of plant species: progress and prospects. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, Berlim, v. 40, p. 427–433, 2004.
- ESCALONA, M. et al. Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems. **Plant Cell Reports**, Berlim, v. 18, p. 743–748, 1999.
- ESPINOSA, P. et al. Production of pineapple transgenic plants assisted by temporary immersion bioreactors. **Plant Cell Reports**, Berlim, v. 21, p. 136–140, 2002.
- ETIENNE, H.; BERTHOULY, M. Temporary immersion systems in plant micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Nova Iorque, v. 69, p. 215–231, 2002.
- GÁMEZ-PASTRANA, R.; GONZÁLEZ-ARNAO, M. T.; MARTÍNEZ-OCAMPO, Y. Thermal events in calcium alginate beads during encapsulation dehydration and encapsulation-vitrification protocols. In: I INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON CRYOPRESERVATION IN HORTICULTURAL SPECIES, Leuven: ISHS, 2011. p. 47–54.
- GARDINER, J. C.; TAYLOR, N. G.; TURNER, S. R. Control of cellulose synthase complex localization in developing xylem. **The Plant Cell**, Rockville, v. 15, p. 1740-1748, 2003.
- GEORGIEV, V. et al. Temporary immersion systems in plant biotechnology. **Engineering in Life Sciences**, Nova Jersey, v. 14, p. 607-621, 2014.
- GONZÁLEZ, E. R. **Transformação genética de *Eucalyptus grandis* e do híbrido *E. grandis* x *E. urophylla* via *Agrobacterium***. 2002. 107 p. Tese (Doutorado em Agronomia. Área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.
- GONZÁLEZ, R. et al. Multiplicación *in vitro* de *Eucalyptus globulus* mediante sistema de inmersión temporal. **Bosque**, Valdivia, v. 32, n. 2, p. 147-154, 2011.

HAJARI, E. et al. Plant regeneration from induced callus of improved Eucalyptus clones. **South African Journal of Botany**, Amsterdam, v. 72, p. 195-201, 2006.

HAO, Y. J.; CHENG, Y. J.; DENG, X. X. Stable maintenance and expression of a foreign gene in transgenic pear shoots retrieved from in vitro conservation. **Journal of Plant Physiology**, Amsterdam, v. 162, n. 2, p. 237–243, 2005.

HUSSEY, S. G., et al. SND2, a NAC transcription factor gene, regulates genes involved in secondary cell wall development in Arabidopsis fibres and increases fibre cell area in Eucalyptus. **BMC Plant Biology**, Londres, v 11, n. 173, p. 1-17, 2011.

IBÁ. Indústria Brasileira de Árvores. Disponível em: <  
[http://www.iba.org/images/shared/iba\\_2015.pdf](http://www.iba.org/images/shared/iba_2015.pdf)> Acesso em: 12 out. 2018.

IBÁ. Indústria Brasileira de Árvores. Disponível em: <  
[https://iba.org/images/shared/Biblioteca/IBA\\_RelatorioAnual2017.pdf](https://iba.org/images/shared/Biblioteca/IBA_RelatorioAnual2017.pdf)> Acesso em: 10 out. 2018.

IBÁ. Indústria Brasileira de Árvores. Disponível em: <  
<https://iba.org/datafiles/publicacoes/relatorios/digital-sumarioexecutivo-2018.pdf>> Acesso em: 11 jan. 2019.

JÚNIOR, D. L.; COLODETTE, J. L. Importância e versatilidade da madeira de eucalipto para a indústria de base florestal. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Brasília, v. 33, n. 76, p. 429-438, 2013.

KACZMARCZYK, A.; ROKKA, V. M.; KELLER, E. R. J. Potato shoot tip cryopreservation. A Review. **Potato Research**, Berlim, v. 54, n. 1, p. 45–79, 2011.

KARTHA, K.; LEUNG, N.; MROGINSKI, L. In vitro growth responses and plant regeneration from cryopreserved meristems of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Zeitschrift für Pflanzenphysiologie**, Stuttgart, v. 107, n. 2, p. 2–6, 1982.

KAYA, E. et al. Cryopreservation of *Eucalyptus* genetic resources. **Cryo Letters**, Lewes, v. 34, n. 6, p. 608–618, 2013.

KIM, H. *et al.* Development of alternative loading solutions in droplet-vitrification procedures. **Cryo Letters**, Lewes, v. 30, n. 3, p. 291–299, 2009.

KIM, S. H.; LEE, C. M.; KAFLE, K. Characterization of crystalline cellulose in biomass: basic principles, applications, and limitations of XRD, NMR, IR, Raman, and SFG. **Korean Journal of Chemical Engineering**, Berlim, v. 30, p. 2127–2141, 2013.

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

LACLAU, J-P. Eucalyptus 2018: Managing Eucalyptus plantations under global changes. Abstracts book. Montpellier: CIRAD, 2018. 225 p.

LAMBARDI, M. Una nuova proposta per la coltura liquida in immersione temporanea: il bioreattore 'ElecTIS'. In: III CONVEGNO NAZIONALE SULLA MICROPROPAGAZIONE, 3., 2017, Pescia, **Anais eletrônicos**...Pescia: VitroSOI, 2017. Disponível em: <<http://www.vitrosoi2017.it/docs/Presentazioni/Sessione3/Lambardi.pdf>>. Acesso em: 18 nov. 2018.

LE ROUX, J. J.; VAN STADEN, J. Micropropagation and tissue culture of *Eucalyptus* - A review. **Tree Physiology**, Oxford, v. 9, p. 435-77, 1991.

LI, J-W. et al. Cryobiotechnology of forest trees: recent advances and future prospects. **Biodiversity and Conservation**, Berlim, v. 27, p. 795-814, 2018.

LORENZO, J. C.; et al. Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Nova Iorque, v. 54, p. 197-200, 1998.

MATEUS, R. P. G.; SILVA, C. M. Biotechnological advances in the soybean. **Ciências Exatas e da Terra e Ciências Agrárias**, São Paulo, v. 8, n. 2, p. 23-27, 2013.

MATSUMOTO, T. et al. Cryopreservation of Persimmon Shoot Tips from Dormant Buds Using the D Cryo-plate Technique. **The Horticulture Journal**, Yamagushi, v. 84, n. 2, p. 106-110, 2015.

MCALISTER, B. et al. Use of temporary immersion bioreactor system (RITA<sup>®</sup>) for production of commercial *Eucalyptus* clones in Mondi Forest (SA). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Nova Iorque, v. 81, n. 3, p. 347-358, 2005.

MCFARLANE, H. E.; DÖRING, A.; Persson, S. The Cell Biology of Cellulose Synthesis. **Annual Review of Plant Biology**, Tóquio, v. 65, p.64-69, 2014.

MCNEIL, M. et al. Structure and function of the primary cell walls of plants. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 53, p. 625-663, 1984.

MEENTS, M. J.; WATANABE, Y.; SAMUELS, A. L. The cell biology of secondary cell wall biosynthesis. **Annals of Botany**, Oxford, p. 1-19, 2018.

MENDONÇA, E. G. et al. The use of continuous, temporary immersion bioreactor system and semisolid culture medium for the production of *Eucalyptus camaldulensis* clones. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 26, n. 4, p. 1211-1224, 2016.

MORGAN, J. L.W.; STRUMILLO, J.; ZIMMER, J. Crystallographic snapshot of cellulose synthesis and membrane translocation. **Nature**, Pretoria, v. 493, p. 181-186, 2013.

NAIRN, B. J. Commercial micropropagation of radiata pine. In: AHUJA, M. R. (Org.) **Micropropagation of woody plants**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1993. p. 383-394.

NAKANO, Y. et al. NAC-MYB-based transcriptional regulation of secondary cell wall biosynthesis in land plants. **Plant Science**, Amsterdam, v.6, 2015.

- NEHRA, N. S. et al. Forest biotechnology: Innovative methods, emerging opportunities. **In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, Tamil Nadu, v. 41, p. 701-717, November-December, 2005.
- NIINO, T. et al. Cryopreservation of mat rush lateral buds by air dehydration using aluminum cryo-plate. **Plant Biotechnology**, Tóquio, v. 31, n. 3, p. 281–287, 2014.
- OLIVEIRA, M. L. de. et al. Efeitos do meio de cultura e da relação bap/ana na multiplicação *in vitro* de clones de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* em biorreator de imersão temporária. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 35, n. 6, p. 1207-1217, 2011a.
- OLIVEIRA, M. L. de. et al. Multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* cultivado em meio semissólido e em biorreator de imersão temporária. **Scientia Forestalis**, Paragominas, v. 39, n. 91, p. 309-315, 2011b.
- OLIVEIRA, M. L. de. et al. Efeito do intervalo de imersão e de injeção de ar na multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* em biorreator de imersão temporária. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 24, n. 1, p. 37-45, 2014.
- PADAYACHEE, K. et al. Cryopreservation as a tool for the conservation of Eucalyptus genetic variability: concepts and challenges. **Southern Forests: a Journal of Forest Science**, Oxfordshire, v. 71, n. 2, p. 165-170, 2009.
- PANIS, B.; LAMBARDI, M. Status of cryopreservation technologies in plants (crops and forest trees). In: THE ROLE OF BIOTECHNOLOGY, 2005, Turim. **Anais eletrônicos...** Turim, 2005. p. 43–54.
- PERSSON, S. et al. Identification of genes required for cellulose synthesis by regression analysis of public microarray data sets. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 102, p. 8633–8638, 2005.
- IBÁ. Indústria Brasileira de Árvores. Disponível em: <[http://www.iba.org/images/shared/iba\\_2015.pdf](http://www.iba.org/images/shared/iba_2015.pdf)> Acesso em: 12 out. 2018.
- PEVS. Produção da Extração vegetal e da Silvicultura. Disponível em: <[https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/media/com\\_mediaibge/arquivos/15f538e9095614fc3204f828b22fa714.pdf](https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/media/com_mediaibge/arquivos/15f538e9095614fc3204f828b22fa714.pdf)> Acesso em: 11 jan. 2019.
- PINTO, D. S. et al. Seleção precoce para características de crescimento em testes clonais de *Eucalyptus urophylla*. **Scientia Forestalis** Piracicaba, v. 42, n. 102, p. 251-257, 2014.
- PRINSEN, P. et al. Morphological characteristics and composition of lipophilic extractives and lignina in Brazilian woods from diferente eucalypt hybrids. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v.36, p. 572-583, 2012.
- PUKACKI, P. M.; JUSZCZYK, K. Desiccation sensitivity and cryopreservation of the embryonic axes of the seeds of two *Acer* species. **Trees**, Upsália, v. 29, p. 385–396, 2015.

- QUANG, T. H., et al. Expression of genes of cellulose and lignin synthesis in *Eucalyptus urophylla* and its relation to some economic traits. **Trees**, Upsália, v.26, n. 3, p. 893-901, 2012.
- QUIALA, E. et al. Morphological and physiological responses of proliferating shoots of teak to temporary immersion and BA treatments. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Nova Iorque, v. 109, p. 223-234, 2012.
- RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**, 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 906p., 2001.
- REED, B. M. Cryopreservation of Bermudagrass Germplasm by Encapsulation Dehydration. **Plant Genetic Resources**, Cambridge, v. 46, p. 6–11, 2006.
- REGUEIRA, M. et al. Micropropagation of axillary shoots of *Salix viminalis* using a temporary immersion system. **Trees**, Upsália, v. 32, p. 61–71, 2018.
- RIBEIRO, S. R. **Regeneração e transformação em *Eucalyptus gradis***. 2012. 54 p. Dissertação (Mestrado em Biologia celular e Biotecologia). Universidade de Lisboa, Lisboa, 2012.
- SACCO, E. et al. Evaluation of Temporary Immersion System for In Vitro Propagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni. **Acta Horticulturae**, Lovaina, v. 1083, n. 41, p. 327-334, 2015.
- SAKAI, A.; KOBAYASHI, S.; OIYAMA, I. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. **Plant Cell Reports**, Berlim, v. 9, n. 1, p. 30–33, 1990.
- SAKAI, A.; ENGELMANN, F. Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: a review. **Cryo Letters**, Lewes, v. 28, n. 3, p. 151–172, 2007.
- SALISBURY, F. B.; ROSS, C. W. **Plant Physiology**. 4. ed. Belmont: Wassworth Publishing Company, 682p., 1991.
- SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, C. et al. Phytohormones and the cell wall in *Arabidopsis* during seedling growth. **Trends in Plant Science**, Amsterdam, v. 15, p. 291-301, 2010.
- SARTORETTO, L. M. et al. Transformação genética: estratégias e aplicações para o melhoramento genético de espécies florestais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.3, p.861-871, 2008.
- SEKIZAWA, K. et al. Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) by vitrification method using aluminium cryo-plates. **Plant Biotechnology**, Tóquio, v. 28, n. 4, p. 401–405, 2011.
- SHINYA, T.; et al., A. Transcript Level Analysis of Lignin and Flavonoid Biosynthesis Related Genes in *Eucalyptus globulus*. **American Journal of Plant Sciences**. Tóquio, v. 5, n.18, p. 2764-2772, 2014.

SOMERVILLE, C. et al. Toward a systems approach to understanding plant cell walls. **Science**, Riverside, v. 306, p. 2206-2211, 2004.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 918 p, 2013.

TAKAGI, H. et al. Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of taro (*Colocasia esculenta* (L.) Schott) by vitrification. 1. Investigation of basic conditions of the vitrification procedure. **Plant Cell Reports**, Berlim, v. 16, n. 9, p. 594–599, 1997.

TAYLOR, N. G. et al. Interactions among three distinct CESA proteins essential for cellulose synthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 100, p. 1450-1455, 2003.

TAYLOR, N. G. et al. The irregular xylem3 locus of *Arabidopsis* encodes a cellulose synthase required for secondary cell wall synthesis. **The Plant Cell**, Rockville, v. 11, p. 769–780, 1999.

TEIXEIRA, J. B. Biorreatores. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 24, p. 36-41, 2002.

THINH, N. T.; TAKAGI, H. Cryopreservation of *Colocasia esculenta* L. Schott (Taro). In: TOWILL, L. E.; BAJAJ, Y. P. S. (Org.). **Biotechnology in Agriculture and Forestry 50**. Springer, Berlim, 2002. p. 96-118.

TIAN, Q., et al. Functional characterization of the poplar R2R3-MYB transcription factor PtoMYB216 involved in the regulation of lignin biosynthesis during wood formation. **PLoS One**, Chongqing, v. 8, n. 10, p. 1-10. 2013.

TORRE, F. de la, et al.; Genetic transformation of *Eucalyptus globulus* using the vascular specific EgCCR as an alternative to the constitutive CaMV35S promoter. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Nova Iorque, v.117, p.77–84, 2014.

TOWILL, L. E. Cryopreservation of Plant Germplasm (Cryopreservation of Seeds). In: TOWILL, L. E.; BAJAJ, Y. P. S. (Org.). **Biotechnology in Agriculture and Forestry 50**. Springer, Berlim, 2002. p. 3-21.

TURNER, S.; GALLOIS, P.; BROWN, D. Tracheary element differentiation. **Plant Biology**, Munique, v. 58, p. 407-433, 2007.

UCHENDU, E. E.; REED, B. M. A comparative study of three cryopreservation protocols effective storage of in vitro-grown mint (*Mentha* SPP.). **Cryo Letters**, Lewes, v. 29, n. 3, p. 181-188, 2008.

VANHOLME, R. et al. Lignin engineering. **Current Opinion in Plant Biology**, Tóquio, v. 11, p. 278–285, 2008.

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

VIDAL, N.; BLANCO, B.; CUENCA, B. A temporary immersion system for micropropagation of axillary of hybrid chestnut. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Nova Iorque, v. 123, p. 229-243, 2015.

VOLK, G. M. et al. Citrus cryopreservation: viability of diverse taxa and histological observations. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Nova Iorque, v. 128, p. 327-334, 2017.

VUJOVIĆ, T. et al. Cryopreservation of *Prunus* spp. using aluminium cryo-plates. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 195, p. 173–182, 2015.

WADL, P. A. **Improved regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of wild strawberry (*Fragaria vesca* L.)**. Dissertação (Mestrado em Horticultura). Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University, Virginia, 2005.

WANG, B. et al. Potential applications of cryogenic technologies to plant genetic improvement and pathogen eradication. **Biotechnology Advances**, Amsterdam, v. 32, n. 3, p. 583–595, 2014.

WELANDER, M. Evaluation of a new vessel system based on temporary immersion system for micropropagation. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 179, P. 227–232, 2014.

WIGHTMAN, R; TURNER, S. Trafficking of the cellulose synthase complex in developing xylem vessels. **Biochemical Society Transactions**, Londres, v. 38, p. 755-760, 2010.

YAMAMOTO, S. et al. Cryopreservation of in vitro- grown shoot tips of strawberry by the vitrification method using aluminium cryo-plates. **Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization**, Cambridge, v. 10, n. 1, p. 14–19, 2011a.

YAMAMOTO, S. et al. Development of a cryopreservation procedure using aluminum cryo-plates. **Cryo Letters**, Lewes, v. 32, n. 3, p. 256–265, 2011b.

YAMAMOTO, S. I. et al. V-cryo-plate procedure as an effective protocol for cryobanks: Case study of mint cryopreservation. **Cryo Letters**, Lewes, v. 33, n. 1, p. 12–23, 2012.

ZHONG, R. et al. Expression of a mutant form of cellulose synthase AtCesA7 causes dominant negative effect on cellulose biosynthesis. **Plant Physiology**, Amsterdam, v. 132, p. 786-795, 2003.

## CAPÍTULO 2 TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE UM HÍBRIDO COMERCIAL DE EUCALIPTO VISANDO O AUMENTO DA SÍNTESE DE CELULOSE

### RESUMO

Devido a grande importância econômica que a celulose apresenta, o desenvolvimento de genótipos com maior produtividade deste polímero são cada vez mais desejados. Estes genótipos podem ser obtidos por meio da transformação genética de plantas, com a inserção de genes relacionados à síntese de celulose. O presente trabalho teve como objetivo a transformação genética do híbrido *Eucalyptus grandis X Eucalyptus urophylla* com o gene *OsCesA4*, que tem papel na produção de celulose na parede celular secundária. Após o processo de transformação do eucalipto com o gene de interesse, foi realizada a seleção das plantas transformadas com o agente seletivo PPT e estas foram confirmadas por meio de PCR convencional. Em seguida foi realizada uma PCR com o *primer* do gene *Bar*, a fim de certificar que o gene amplificado não era endógeno do eucalipto e sim o presente no cassete gênico inserido nas plantas. Além disso para certificar que este gene não era uma contaminação por *Agrobacterium tumefaciens*, foi realizada uma PCR com os *primers* do gene que confere resistência aos antibióticos estreptomicina e espectinomicina (Sm/Sp). Após a confirmação das plantas *in vitro* que passaram pelo processo de transformação, estas foram aclimatizadas em casa de vegetação e o teor de celulose foi analisado. Além disso uma outra PCR, utilizando os *primers* do gene de interesse foi realizada com as plantas aclimatizadas. Dos 6 eventos sobreviventes ao PPT, 5 apresentaram o amplicom do gene de interesse na PCR realizada com as plantas *in vitro*. Também foi confirmada a inserção do cassete gênico nos 5 eventos por meio da PCR com os *primers* do gene *Bar*. Já a PCR para verificar se as plantas estavam contaminadas por *A. tumefaciens* foi inconclusiva, devido a amplificação em todos os eventos e inclusive a planta controle. A PCR utilizando o DNA das plantas aclimatizadas não apresentou reprodutibilidade comparado a PCR das plantas *in vitro*. Associado a estes resultados, o teor de celulose das plantas que passaram pela transformação e plantas controle foram estatisticamente iguais, sugerindo desta forma que as plantas que sobreviveram ao agente seletivo eram quimeras. A regeneração das plantas quimeras foi atribuída à concentração de PPT utilizada no meio de seleção, que pode ter sido muito baixa, e a proteção das células não transformadas pelas células transformadas que as circundavam.

**Palavras-chave:** Eucalipto. *OsCesA4*. Agente seletivo. Teor de celulose. Quimeras.

## ABSTRACT

Due to the great economic importance presented by cellulose, the development of genotypes with higher productivity of this polymer are increasingly desired. These genotypes can be obtained through genetic transformation of plants, with the insertion of genes related to the cellulose synthesis. The present work aimed at the genetic transformation of the *Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus urophylla* hybrid with the *OsCesA4* gene, which plays a role in cellulose production in the secondary cell wall. After the eucalyptus' transformation with the gene of interest, the transformed plants were selected with the PPT selective agent and confirmed by conventional PCR. Then PCR was performed with the primer of the Bar gene to certify that the amplified gene was not endogenous to eucalyptus but rather present in the gene cassette inserted in the plants. In addition to certifying that this gene was not a contamination by *Agrobacterium tumefaciens*, a PCR was performed with the primers of the antibiotic resistance-conferring gene streptomycin and spectinomycin (Sm / Sp). After confirming the in vitro plants that underwent the transformation process, they were acclimatized in an greenhouse and the cellulose content was analyzed. In addition, another PCR using the primers of the gene of interest was performed with the acclimatized plants. Of the 6 events that survived to PPT, 5 presented the amplicon of the gene of interest in the PCR performed with the plants in vitro. It was also confirmed the insertion of the gene cassette in the 5 events by PCR with the primers of the Bar gene. The PCR to verify whether the plants were contaminated by *A. tumefaciens* was inconclusive, due to the amplification in all the events (even in the control plant). PCR using the DNA of the acclimatized plants showed no reproducibility compared to PCR of plants in vitro. Associated with these results, the cellulose content of the plants that underwent the transformation and control plants were statistically the same, suggesting that the plants that survived the selective agent were chimeras. The regeneration of chimera plants was attributed to the concentration of PPT used in the selection medium, which may have been very low, and the protection of the untransformed cells by the surrounding transformed cells.

**Keywords:** Eucalyptus. *OsCesA4*. Selective agent. Cellulose content. Chimeras.

## 1 INTRODUÇÃO

A produção de celulose vem crescendo cada vez mais no cenário mundial, principalmente devido às fibras curtas, matéria prima proveniente da árvore de eucalipto (IBÁ, 2017). Em 2018, o Brasil alcançou a segunda posição na produção mundial de celulose com 19,5 milhões de toneladas (IBÁ, 2018), sendo que as espécies de eucalipto mais utilizadas para o fornecimento de fibras curtas são *Eucalyptus grandis*, *E. saligna*, *E. urophylla* bem como o híbrido *E. grandis x E. urophylla* (REMADE, 2002).

A importância econômica deste polímero se deve ao fato dele ser utilizado não só na indústria de papel, mas também nas indústrias têxtil, farmacêutica, alimentícia e de cosméticos (BNDES, 2014). Recentemente a celulose também tem sido utilizada como uma fonte renovável de biocombustível (MEENTS; WATANABE; SAMUELS, 2018).

Nos vegetais, a celulose está presente nas paredes celulares e sua síntese ocorre por meio de proteínas denominadas CesA, as quais juntas formam um complexo denominado Complexo Celulose Sintase (CCS). Cada uma destas proteínas CesA é codificada por um determinado gene *CesA*, os quais podem variar em número de acordo com cada espécie (DOBLIN et al., 2002). Em *Arabidopsis* por exemplo, *AtCesA1*, *AtCesA3* e um dos *AtCesA2/5/6/9* estão envolvidos na síntese de celulose da parede primária (DOBLIN et al., 2002) e *AtCesA4*, *AtCesA7* e *AtCesA8* são essenciais na síntese de celulose da parede secundária (PERSSON et al., 2005).

Diante da importância econômica da produção de celulose em árvores de eucalipto, a qual os genes *CesA* possuem papel fundamental, a busca por melhorias neste gênero visando uma produtividade cada vez maior é frequente, e árvores com características fenotípicas de interesse têm sido selecionadas no decorrer do tempo e introduzidas em programas de melhoramento, a fim de obter genótipos mais produtivos (GARTLAND et al., 2003).

Além disso, associadas à estes programas de melhoramento, aplicações biotecnológicas, como a transformação genética, podem melhorar características, que permitirão ganhos tanto em produtividade como em sustentabilidade, as quais via método de melhoramento convencional são consideradas impraticáveis (NEHRA et al., 2005, TORRE et al., 2014).

O presente estudo teve como objetivo transformar um híbrido comercial de eucalipto via *Agrobacterium tumefaciens* inserindo o gene *OsCesA4* e avaliar se houve alteração desse composto na parede celular secundária das fibras de eucalipto.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

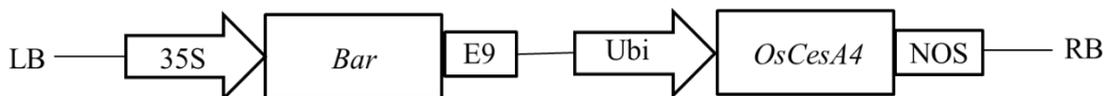
### 2.1 Local de condução e material vegetal

O experimento foi conduzido no Laboratório Central de Biologia Molecular (LCBM), na Universidade Federal de Lavras (UFLA). Os ápices caulinares, utilizados como explante para o experimento de transformação, foram obtidos a partir de plantas do híbrido comercial de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* estabelecidas *in vitro* e mantidas em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, luminosidade de  $35 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  e temperatura de  $26 \pm 2^\circ\text{C}$ .

### 2.2 Construção do plasmídeo

Para a transformação genética foi utilizado o vetor binário p7i2x, contendo o cassete gênico (FIGURA 4) a ser inserido no genoma da planta, múltiplos sítios de clonagem, genes marcadores de seleção, além das sequências das bordas esquerda e direita necessárias para o reconhecimento da maquinaria natural da *Agrobacterium tumefaciens*. O cassete gênico contém um promotor da Ubiquitina, o gene de interesse *OsCesA4* isolado de arroz e homólogo de *AtCesA8*, um terminador NOS-T e o gene marcador de seleção de plantas *Bar*, o qual confere resistência ao herbicida Fosfinotricina (PPT), flanqueado pelo promotor constitutivo 35-S e o terminador E9. Este vetor binário também contém o gene de resistência aos antibióticos Espectinomomicina e Estreptomomicina utilizados para a seleção das bactérias transformadas.

Figura 4 – Esquema do cassete gênico, contendo o gene de seleção *Bar*, seu promotor 35S e o terminador E9, e o gene de interesse *OsCesA4*, com o promotor da Ubiquitina e o terminador NOS. LB – borda esquerda, RB – borda direita.



Fonte: Preparada pela autora.

### 2.3 Confirmação da presença do vetor em *Agrobacterium tumefaciens*

Para o processo de infecção nos calos foram utilizadas bactérias transformadas, estocadas à  $-80^\circ\text{C}$  no Laboratório Central de Biologia Molecular (LCBM), da Universidade

Federal de Lavras (UFLA). Para a confirmação da presença do vetor nas bactérias foi realizada uma Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando o *primer* que amplifica o gene de interesse, no caso o *OsCesA4*. Para este procedimento foi realizada a extração do DNA plasmidial através da lise celular utilizando uma solução alcalina. Para isso 10µL da solução do estoque de bactérias (estoque em glicerol) foi colocada em 5 mL de meio LB líquido contendo os antibióticos Espectinomicina 100 µg/mL e Estreptomicina 300 µg/mL (concentrações no meio de cultura). Estas bactérias cresceram por 48 horas a 28°C sob rotação de 200 rpm. Desta solução foram transferidos 2 mL para microtubos e centrifugados a 14000 rpm por 2 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso com 200µL de uma primeira solução (50 mM TRIS, 10 mM EDTA, 0,1 g/L RNase A, a um pH de 8,0), utilizando vortex. Para a lise celular 200µL de uma segunda solução alcalina (200 mM NaOH e 1% p/v SDS) foi adicionado e, sucessivamente, mais 200 µL de uma terceira solução (3M Acetato de Potássio a um pH de 5,5).

As amostras permaneceram 10 minutos em gelo e foram centrifugadas a 14000 rpm por 10 minutos. Os sobrenadantes foram transferidos para microtubos de 1,5 mL, contendo 450 µL de isopropanol 100%, para a precipitação do DNA plasmidial. Os microtubos permaneceram em temperatura ambiente por 5 minutos e foram centrifugados, novamente, a 14000 rpm por 10 minutos para a formação do *pellet* contendo o plasmídeo. O álcool isopropílico foi retirado e acrescentado etanol 75% com o intuito de lavar o *pellet*. O etanol foi descartado e o *pellet* ressuspenso com 20 µL do tampão TE (10mM Tris, 1mM EDTA a um pH de 8,0).

O DNA plasmidial obtido foi quantificado em espectrofotômetro (Nanodrop® ND-1000) a  $A_{260}$  nm. Para a amplificação do gene *OsCesA4* foi realizada uma reação contendo 1 U de GoTaq® Flexi DNA polimerase (Promega®), 3 µL tampão 5 X, 0,6 mM/L dNTP mix, 1,75 mM de MgCl, 0,4 µM de *primer* do gene (Fw: 5' - GGAAAGAGATTGGCTGGAT e Rv: 5' – GATGCCGATGCCACTCCACC), 5% de DMSO e 3,33 ng/µL do DNA extraído, completando o volume final com água ultrapura autoclavada para 25 µL. A amplificação foi realizada em termociclador Eppendorf® Mastercycler, programado com temperatura de desnaturação inicial de 95 °C por 5 minutos, 30 ciclos de amplificação compostos de 3 etapas: 95 °C, por 30 segundos; 60°C por 30 segundos; 72 °C, por 2 minutos com uma extensão final de 2 minutos a 72 °C. O resultado da PCR foi visualizado a partir da técnica de eletroforese em gel de agarose 1% (80 mL TAE, 0,8g agarose e 0,8µL de Brometo de Etídio) sob uma voltagem de 80 V, por um período de 50 minutos, esperando a amplificação de um fragmento

de 456 pb. Após confirmação, a bactéria foi utilizada para o procedimento de transformação genética dos calos de eucalipto.

#### 2.4 Transformação genética do clone LCBM2

Para a transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens* foram utilizados calos organogênicos do clone comercial LCBM2 de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* formados a partir do meio de cultura desenvolvido por Batista (2012). Para a indução dos calos, 300 ápices caulinares foram inoculados em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) acrescido de 0,001 mg/L de ANA (ácido naftaleno acético), 0,1 mg/L de TDZ (Thidiazuron), 30 g/L de sacarose e 4,9 g/L de ágar (meio de indução de calos), onde permaneceram por um período de 10 dias no escuro à uma temperatura de  $26 \pm 2^\circ\text{C}$ , até o momento da infecção.

Para a infecção dos calos foram utilizadas as bactérias confirmadamente transformadas. Para isso 10  $\mu\text{L}$  da cepa LBA4404 foi inoculada em 5 mL de meio LB líquido suplementado com antibióticos Espectinomicina 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e Estreptomicina 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (concentrações no meio de cultura) e permaneceram sob agitação de 200 rpm a  $28^\circ\text{C}$  por 48 horas. Após este tempo, foi adicionado ao pré-inóculo 100 mL de meio LB com os respectivos antibióticos onde permaneceram novamente sob agitação nas mesmas condições citadas acima. Para o processo de transformação, as bactérias foram transferidas para tubos falcon de 50 mL e centrifugadas a 5000 rpm por 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o *pellet*, contendo as bactérias, foi ressuspensionado em meio de indução líquido contendo 100  $\mu\text{M}$  de acetoseringona, até atingir uma densidade óptica de 0,45.

Os calos a serem transformados foram transferidos para erlenmeyers de 25 mL, contendo 10 mL do meio líquido com as bactérias. Os erlenmeyers foram colocados em uma câmara de vácuo e submetidos a um vácuo de 400 mmHg por 4 minutos (BALIEIRO, 2013). Ao todo, 200 calos foram transformados, 50 passaram pelo mesmo processo, porém sem contato com a bactéria (controle infiltração) e os outros 50 foram diretamente transferidos para meio de indução de calos, sem passarem pelo processo de infiltração (controle total).

Após este processo, os calos transformados foram inoculados em um novo meio de indução sólido apresentando a mesma composição dos anteriores, mas acrescido de 100  $\mu\text{M}$  de acetoseringona, onde permaneceram por 5 dias no escuro com temperatura de  $26^\circ\text{C} \pm 2$ , para a fase de co-cultivo. Depois desta fase, os calos foram novamente transferidos para outro meio de indução contendo 500 mg/L de Tioxin<sup>®</sup>, para a eliminação das *A. tumefaciens*, onde permaneceram por 15 dias em salas de cultivo nas mesmas condições anteriores.

Depois de 30 dias em meio de indução, os calos foram transferidos para meio de regeneração MS acrescido de 0,1 mg/L de ANA, 0,3 mg/L de BAP (6-benzilaminopurina), 30 g/L de sacarose e 4,9 g/L de ágar (BATISTA, 2012). Além disso, foi adicionado a este meio o herbicida fosfinotricina (FINALE<sup>®</sup>) na concentração de 0,6 mg/L (testada em experimentos anteriores) para a seleção das plantas transformadas. Aos 15 dias, os calos foram subcultivados para um novo meio de regeneração com a mesma composição citada anteriormente, além da presença do herbicida fosfinotricina, e mantidos em sala de crescimento com temperatura de  $26^{\circ}\text{C} \pm 2$  e luminosidade de  $35 \mu\text{M}$  fótons/ $\text{m}^2/\text{s}$ .

Após este período, plantas provenientes dos calos foram excisadas e transferidas para meios de multiplicação MS acrescido de 1 mg/L de AIA (ácido indolacético), 0,03 mg/L de BAP, 20 g/L de sacarose, 1,7 g/L de phytigel e 0,6 mg/L de fosfinotricina para a sucessiva seleção das plantas. As plantas foram subcultivadas a cada 30 dias até atingirem um tamanho ideal para as posteriores avaliações e até todas as plantas, do controle infiltração, serem eliminadas.

## 2.5 Extração do DNA genômico

Para extração do DNA genômico foi utilizado o protocolo de extração CTAB (*Cationic Hexadecyl Trimethyl Ammonium Bromide*) com modificações. A parte aérea das plantas sobreviventes ao herbicida foi coletada, macerada em nitrogênio líquido e transferida para *epENDORF* de 2 mL. Após este procedimento, foi acrescido a cada *epENDORF* 1,4 mL do tampão CTAB (2% p/v CTAB; 2,5% p/v de PVP-40; 2M NaCl; 100 mM tris-HCl pH 8,0; 25 mM EDTA pH 8,0) e em seguida foi adicionado 2% (v/v) de  $\beta$ -mercaptoetanol (cerca de 28  $\mu\text{L}$ ) em cada amostra e homogeneizado por 30 segundos com auxílio de vórtex. As amostras foram colocadas em *Thermomixer comfort* por 40 minutos a  $65^{\circ}\text{C}$  e homogeneizadas por inversão a cada 10 minutos. Após este período as amostras foram submetidas a um choque térmico em gelo por 5 minutos para a posterior centrifugação por 10 minutos a 11000 rpm. Em seguida, aproximadamente 800  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foi coletado e transferido para um novo tubo de 2 mL, onde foi acrescentado 800  $\mu\text{L}$  da mistura clorofórmio: álcool isoamílico (24:1 (v/v)) seguido de uma homogeneização por inversão por 10 min. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 11000 rpm e o sobrenadante, novamente, coletado (aproximadamente 600  $\mu\text{L}$ ) e transferido para um novo tubo de 1,5 mL.

Para a precipitação do DNA genômico, a cada amostra foi adicionado 600  $\mu\text{L}$  de álcool isopropílico gelado, homogeneizada por inversão e incubada a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 2-4 horas.

Após esta etapa, as amostras foram centrifugadas por 20 minutos a 11000 rpm e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi lavado com 500 µL de etanol 70% gelado. Depois, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 11000 rpm. Após a retirada do etanol e a secagem do *pellet*, este foi ressuscitado com 50 µL do tampão TE e armazenado a -20°C. O DNA genômico foi quantificado em espectrofotômetro (Nanodrop® ND-1000) a A<sub>260</sub> nm.

## 2.6 Confirmação da presença do gene *OsCesA4* através da inserção do cassete gênico nas plantas

Para a confirmação da presença do gene de interesse no genoma da planta foi realizada PCR convencional, contendo 1 U de GoTaq® Flexi DNA polimerase (Promega®), 3 µL tampão 5 X, 0,6 mMol/L dNTP mix, 1,75 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,4 µM de *primer* do gene e 3,33 ng/µL de DNA, completando o volume final com água ultrapura autoclavada para 25 µL. A amplificação foi realizada em termociclador Eppendorf® Mastercycler, programado com temperatura de desnaturação inicial de 95 °C, por 5 minutos, 35 ciclos de amplificação compostos de 3 etapas: 95 °C, por 30 segundos; 60°C por 30 segundos (anelamento do *primer*); 72 °C, por 2 minutos com uma extensão final de 10 minutos a 72 °C.

O resultado da PCR foi visualizado a partir da técnica de eletroforese em gel de agarose 1% (80 mL TAE, 0,8 g agarose e 0,8 µL de Brometo de Etídio) sob uma voltagem de 80 V por 50 minutos, esperando a amplificação de um fragmento com 456 pb.

Para certificar de que o gene de interesse amplificado não era endógeno do eucalipto foi realizada uma PCR com os *primers* do gene *Bar* (Fw: 5' - TGCACCATCGTCAACCAC e Rv: 5' – GGCATGACGTGGGTTTCT). A amplificação foi realizada em termociclador Eppendorf® Mastercycler, programado com temperatura de desnaturação inicial de 95 °C, por 10 minutos, 35 ciclos de amplificação compostos de 3 etapas: 95 °C, por 30 segundos; 61°C por 30 segundos (anelamento do *primer*); 72 °C, por 2 minutos com uma extensão final de 10 minutos a 72 °C.

O resultado da PCR foi visualizado a partir da técnica de eletroforese em gel de agarose 1% (80 mL TAE, 0,8 g agarose e 0,8 µL de Brometo de Etídio) sob uma voltagem de 80 V por 50 minutos, esperando a amplificação de um fragmento com 616 pb.

Para certificar que a amplificação nas plantas não era uma possível contaminação por *A. tumefaciens* foi realizada uma PCR com os *primers* do gene que confere resistência aos antibióticos estreptomicina e espectinomicina (Sm/Sp) (Fw: 5' –

GCGGTTTTTCATGGCTTGTTA e Rv: 5' – GCCGAAGTTTCCAAAAGGTC). A amplificação foi realizada em termociclador Eppendorf® Mastercycler, programado com temperatura de desnaturação inicial de 95 °C, por 5 minutos, 35 ciclos de amplificação compostos de 3 etapas: 95 °C, por 30 segundos; 63,5°C por 30 segundos (Anelamento do *primer*); 72 °C, por 2 minutos com uma extensão final de 2 minutos a 72 °C.

O resultado da PCR foi visualizado a partir da técnica de eletroforese em gel de agarose 1% (80 mL TAE, 0,8g agarose e 0,8µL de Brometo de Etídio) sob uma voltagem de 80 V por 50 minutos, esperando a amplificação de um fragmento com 383 pb.

## **2.7 Enraizamento e aclimatização das plantas**

Após a confirmação e multiplicação das plantas transformadas, estas foram transferidas para meio de enraizamento MS ¼ força, acrescido de 15 g/L de sacarose, pantotenato de cálcio, biotina, ácido indol-butírico (AIB) na concentração de 0,1 mg/L e 4,9 g/L de ágar. As plantas foram mantidas neste meio por 30 dias. Após este período, as plantas passaram pelo processo de aclimatização em que estas foram transplantadas para copos plásticos descartáveis de 770 mL, com substrato comercial, e cada uma foi revestida por um saco plástico e transferida para casa de vegetação com 90% de umidade relativa do ar, temperatura média de 31°C, sistema de nebulização automático a cada 5 minutos, fotoperíodo de 12 horas e intensidade de luz de 52 µmol/m<sup>2</sup>/s. Após 2 dias foi realizado um corte em um dos vértices do saco plástico, depois de 5 dias do primeiro corte o outro vértice foi cortado e passados mais 5 dias toda a parte superior do saco plástico foi retirada. Após 30 dias em casa de vegetação, os caules das plantas aclimatizadas foram coletados e macerados para posterior análise de celulose (as plantas foram irrigadas desde o primeiro corte no saco plástico).

## **2.8 Quantificação de celulose na parede celular**

Para extração e quantificação de celulose da parede celular de eucalipto foi utilizado o protocolo de Tang et al. (2015) com modificações. Para extração da celulose, 500 mg de caule de eucalipto de plantas provenientes da estufa foram macerados em nitrogênio líquido. Depois disso o material macerado foi seco em estufa à 65°C por 2 dias e logo após a massa seca das amostras foi pesada. O macerado foi tratado com 1,25 mL de etanol 80% por 1 h e centrifugado a 10000 rpm por 10 min à temperatura ambiente. Em seguida o sobrenadante foi descartado e o macerado foi tratado com 1,25 mL de etanol 100% por 1 h e centrifugado nas

mesmas condições acima. O sobrenadante foi novamente descartado e foi acrescentado 1,25 mL de acetona a 100% por 3 vezes durante 10 min cada vez. Ao final de cada tempo as amostras foram centrifugadas a 10000 rpm por 10 min à temperatura ambiente. Os resíduos insolúveis em álcool (AIR) obtido dos tratamentos com etanol e acetona, foram secos sob vácuo no *Eppendorf - Concentrator 5301* à 60°C por 2 h e hidrolisados com 1 mL de ácido trifluoracético (TFA) 2 M à 120°C por 2 h. Após o esfriamento das amostras, estas foram centrifugadas à 3000 rpm por 3 min à temperatura ambiente para a separação dos monossacarídeos hidrolisados da celulose não digerida. A celulose não digerida (*pellet*) foi ressuspendida em 800 µL de água destilada, agitada em vórtex e centrifugada à 3000 rpm por 3 min. Essa última lavagem foi repetida por 5 vezes e na quinta lavagem o sobrenadante foi descartado. Depois foi adicionado mais 800 µL de água destilada e agitada novamente em vórtex. Destes 800 µL, foram colocados 200 µL da suspensão em tubos de ensaio. Em cada tubo com 200 µL da suspensão (amostra + água), foi adicionado 200 µL de fenol a 5% (v/v) e 2 mL de ácido sulfúrico P.A. A mistura foi rapidamente agitada em vórtex por ~3 segundos e deixadas por 4 h em descanso à temperatura ambiente. Após este período foi realizada a leitura das amostras em Nanodrop à 500 nm. Para a curva padrão, 0,015 g de Celulose Microcristalina P.A da marca *Synth* foi pesada e ressuspendida em 800 µL de água destilada. Dos 800 µL da suspensão, 200 µL foram colocados em um tubo de ensaio e as mesmas quantidades de fenol e ácido sulfúrico foram adicionados como mencionado acima e procedeu-se da mesma maneira realizada para as amostras. Foram realizadas a leitura de ao menos 5 pontos para a confecção da curva.

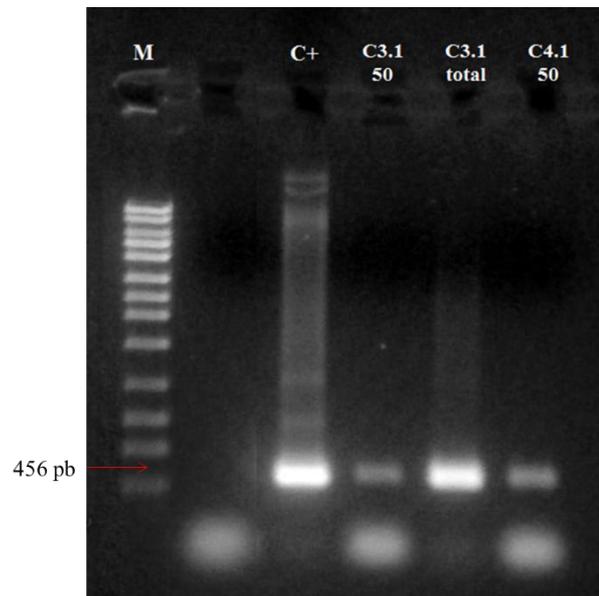
Para o experimento de quantificação de celulose foi utilizado o Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC), com 6 tratamentos (planta controle e 5 eventos confirmados – cada evento representado por uma única planta) e 6 repetições por tratamento, sendo cada repetição composta de uma planta. Os dados foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de *Scott-Knott* ( $p < 0,05$ ) através do programa estatístico SISVAR versão 4.3 (FERREIRA, 1999).

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Confirmação da presença do vetor em *Agrobacterium tumefaciens*

Após o procedimento de lise celular em *A. tumefaciens*, foi realizada uma PCR com o DNA plasmidial obtido e o resultado desta PCR foi observado no gel de agarose representado pela Figura 1. Neste gel observa-se o amplicon de 456 pb, correspondente ao gene de interesse *OsCesA4*, nas duas colônias de *A. tumefaciens* analisadas (C3.1, na concentração total de DNA e na concentração diluída à 50 ng/μL, e a colônia C4.1, diluída à 50 ng/μL). Para o controle positivo (C+) foi utilizado DNA da bactéria *Escherichia coli* transformada. Este resultado confirma a inserção do gene de interesse em *A. tumefaciens*.

Figura 1 – Gel de agarose com colônias de *Agrobacterium tumefaciens* transformadas. M: marcador molecular de 10000 pb; C+: DNA de *E. coli* transformada; C3.1 50: colônia 3 de *A. tumefaciens* com DNA a 50 ng/μL; C3.1 total: colônia 3.1 de *A. tumefaciens* com DNA sem diluição e C4.1 50: colônia 4.1 de *A. tumefaciens* com DNA a 50 ng/μL.



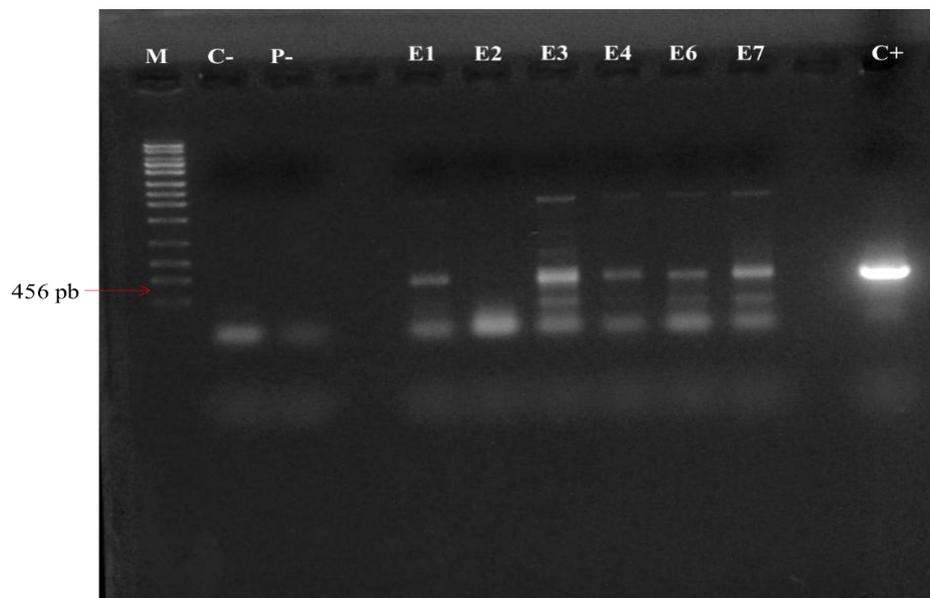
Fonte: Preparada pela autora.

#### 3.2 Confirmação da presença do gene *OsCesA4* por meio da inserção do cassete gênico nas plantas

Com a confirmação da inserção do gene de interesse em *A. tumefaciens*, realizou-se a transformação genética dos calos de *E. grandis* X *E. urophylla* pelo método de transformação

indireto, utilizando a bactéria *A. tumefaciens*. Depois do processo de transformação, realizou-se uma PCR com o DNA genômico das plantas que sobreviveram ao processo de seleção, com o herbicida Fosfinotricina (PPT), e o resultado desta PCR foi observado no gel de agarose representado pela Figura 2. Das plantas que sobreviveram ao processo de seleção, em 5 dos 6 eventos analisados observou-se um amplicon de 456 pb, correspondente ao tamanho do gene de interesse *OsCesA4*. O evento 2 foi o único que não apresentou o amplicon de 456 pb, sendo este um possível escape. Como esperado, não houve amplificação da planta controle (P-). Para o controle positivo, representado por C+, foi utilizado o DNA de *A. tumefaciens* e para o controle negativo da reação, representado por C-, foi utilizado água no lugar do DNA.

Figura 2 – Gel de agarose da confirmação de 5 eventos contendo o gene de interesse *OsCesA4* em plantas de eucalipto. M: marcador molecular de 10000 pb; C-: controle negativo (água); P-: planta controle (não transformada); E1, E3, E4, E6 e E7: eventos confirmados (cada um representado por uma única planta de eucalipto), E2: planta não confirmada (escape); C+: controle positivo (DNA de *A. tumefasciens* transformada).

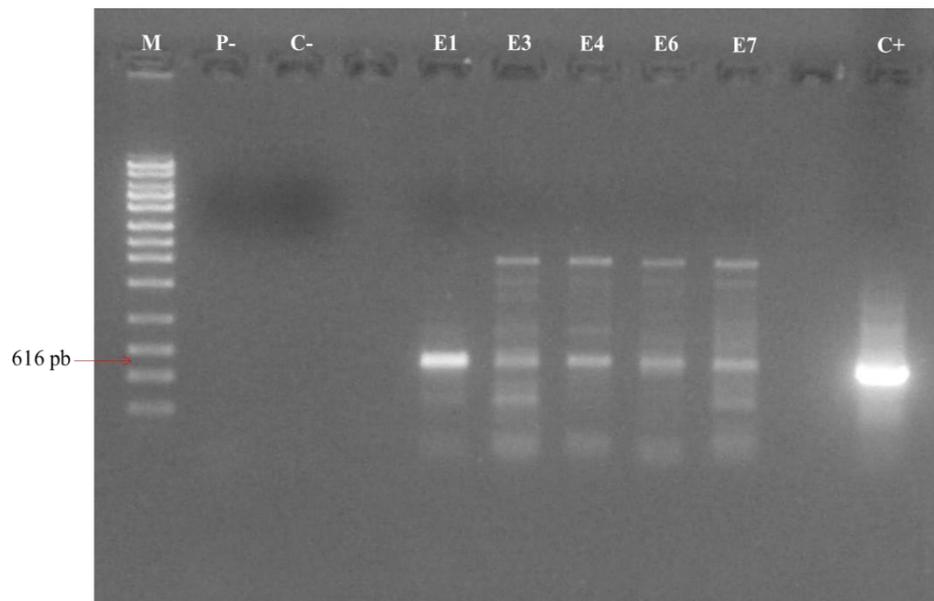


Fonte: Preparada pela autora.

Com a confirmação da presença do gene *OsCesA4* nas plantas foi realizada uma outra PCR, com o DNA das plantas que passaram pelo processo de seleção com o PPT, porém desta vez foi utilizado os *primers* do gene de seleção *Bar*, a fim de certificar que a amplificação do gel anterior não era de um gene endógeno do eucalipto e sim do gene de interesse *OsCesA4* inserido nas plantas por meio do cassete gênico, o qual também contém o gene *Bar*. O resultado desta PCR foi observado no gel de agarose representado pela Figura 3, em que os 5

eventos confirmados anteriormente apresentaram um amplicon de 616 pb, correspondente ao gene de seleção *Bar*. Este resultado mostra que o gene amplificado foi mesmo o inserido nas plantas e não um gene endógeno do eucalipto.

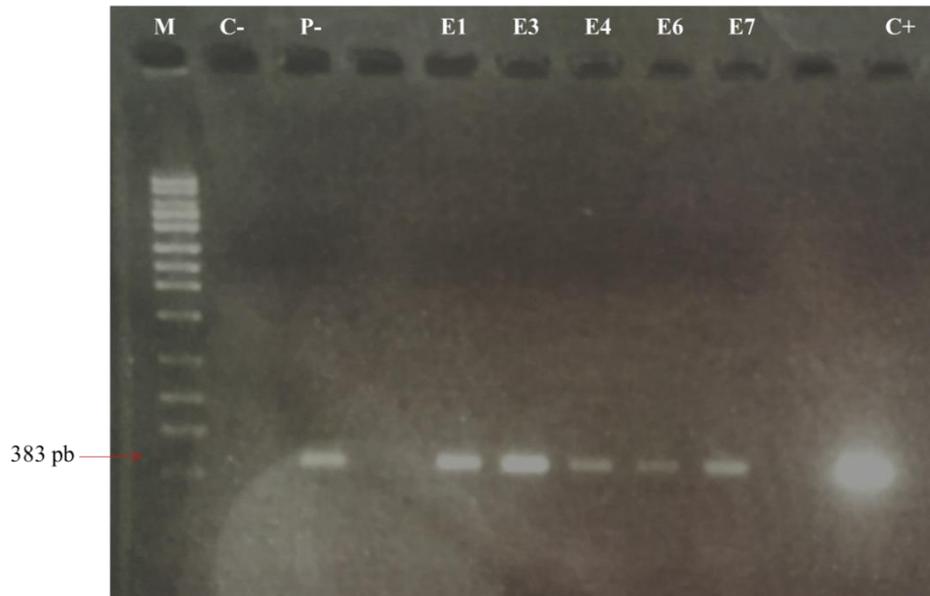
Figura 3 – Gel de agarose para a confirmação da inserção do cassete gênico nas plantas através do gene *Bar*. M: marcador molecular de 10000 pb; C-: controle negativo (água); P-: planta controle (não transformada); E1, E3, E4, E6 e E7: eventos confirmados (cada um representado por uma única planta de eucalipto), C+: controle positivo (DNA de *A. tumefaciens* transformada).



Fonte: Preparada pela autora.

Com a certificação de que o gene amplificado nas plantas não era endógeno do eucalipto, o próximo passo foi realizar uma PCR com o DNA genômico das plantas, utilizando os *primers* do gene que confere resistência aos antibióticos estreptomicina e espectinomicina (Sm/Sp), a fim de verificar uma possível contaminação das plantas pela *A. tumefaciens*. O resultado desta PCR pode ser visualizado na Figura 4, o qual pode-se observar uma amplificação do gene em todos os eventos anteriormente confirmados e inclusive da planta controle (planta não transformada). Visto que este gene está presente apenas em *A. tumefaciens*, o resultado esperado era de que nenhuma planta apresentasse o amplicon deste gene (383 pb), o que não ocorreu no presente estudo. Porém não podemos afirmar com certeza que as plantas que passaram pela transformação estão contaminadas pela *A. tumefaciens*, visto um amplicon na mesma altura destas plantas foi apresentado pela planta controle, a qual não teve nenhum contato com a bactéria.

Figura 4 – Gel de agarose para verificação de possível contaminação com *A. tumefaciens* através do gene que confere resistência à estreptomicina e espectinomicina (Sm/Sp). M: marcador molecular de 10000 pb; C-: controle negativo (água); P-: planta controle (não transformada); E1, E3, E4, E6 e E7: eventos confirmados (cada um representado por uma única planta de eucalipto), C+: controle positivo (DNA de *A. tumefaciens* transformada).



Fonte: Preparada pela autora.

### 3.3 Quantificação de celulose na parede celular

Plantas provenientes dos 5 eventos confirmados foram aclimatizadas em estufa e após um mês foi avaliado o teor de celulose das mesmas. De acordo com a Tabela 1 podemos observar que não houve diferença estatística no teor de celulose nas plantas que passaram pelo processo de transformação genética quando comparadas com as plantas que não passaram por este processo (controle).

Tabela 1 – Teor de celulose em mg/g de massa seca de caule de *E. grandis* x *E. urophylla*.

Tratamentos	Teor de Celulose (mg/g)
Controle	135,52 a
Evento 1	165,49 a
Evento 3	111,06 a
Evento 4	113,92 a
Evento 6	104,86 a
Evento 7	126,32 a

Médias seguidas da mesma letra pertencem ao mesmo grupo (*Scott-Knott*,  $p < 0,05$ ).

## 4 DISCUSSÃO

O segmento de celulose é o que mais cresce no setor de árvores plantadas no Brasil, sendo o eucalipto o principal fornecedor deste polímero. Desta forma, o estudo de genes que alteram a composição da celulose na parede celular do eucalipto é muito importante.

No presente estudo, embora houve a confirmação da inserção do gene *OsCesA4* nas plantas que passaram pelo processo de transformação, não foi possível concluir que estas plantas estavam realmente transformadas. Primeiramente porque o gel para verificação de uma possível contaminação com *A. tumefaciens* foi inconclusivo. Isto porque todos os eventos anteriormente confirmados apresentaram amplificação, inclusive a planta não transformada, desta forma, não se pode afirmar que o gene amplificado foi o inserido no genoma das plantas ou se era o da bactéria *A. tumefaciens*, o qual de alguma forma possa ter permanecido nas plantas. Um outro ponto também coloca em dúvida se as plantas confirmadas estavam ou não transformadas. Após a aclimatização das plantas que passaram pelo processo de transformação, uma nova PCR foi realizada utilizando o DNA destas plantas e os mesmos parâmetros estabelecidos na PCR das plantas *in vitro*. Porém, não foi observada reprodutibilidade deste novo gel quando comparado com o gel de confirmação das plantas *in vitro*. Problemas como amplificação da planta controle (planta não transformada) ou ausência do amplicon de interesse nas plantas supostamente transformadas estavam presentes neste gel (gel não apresentado).

Diante destes resultados, surgiu a hipótese das plantas que passaram pelo processo de transformação serem plantas quimeras, ou seja, brotações compostas de uma mistura de tecidos transformados e tecidos não transformados (DOMÍNGUEZ et al., 2004).

O fenômeno de plantas quimeras foi relatado em várias espécies de dicotiledôneas que passaram pelo processo de transformação com *Agrobacterium*, tais como soja (CHRISTOU, 1990), citrus (DOMÍNGUEZ et al., 2004), *Vigna mungo* (MURUGANANTHAM et al., 2007), dentre outras.

Uma hipótese levantada neste estudo que possa ter levado a regeneração de plantas quimeras é a concentração de PPT que foi utilizada para selecionar as plantas. Para a seleção de plantas que passam pelo processo de transformação genética deve-se primeiramente estabelecer uma curva de mortalidade para o agente seletivo, a fim de aumentar a eficiência de seleção dos eventos transformantes (SELVARAJ et al., 2000). Para a obtenção do máximo de transformantes, determina-se utilizar a concentração do agente seletivo que inibe 100% do

crescimento das plantas controle e permite a regeneração das plantas transformadas (PARK et al., 1998).

Em experimentos de tabaco (*Nicotiana tabacum* L. cv. Wisconsin) para determinar o nível letal do herbicida PPT, foram escolhidas três concentrações para selecionar as plantas que passaram pelo processo de transformação (2, 3 e 4 mg/L de PPT), visto que em nenhuma delas ocorreu regeneração de brotos. Depois da seleção com o PPT, as plantas sobreviventes às três concentrações utilizadas foram analisadas por *Southern blot*, a fim de verificar a presença do transgene nas plantas. O resultado observado foi que apenas as plantas sobreviventes a concentração de 4 mg/L de PPT apresentaram o transgene, o que mostra que as concentrações de 2 e 3 mg/L de PPT, as quais neste estudo foram consideradas como as mínimas concentrações letais para a seleção, originou uma alta frequência de regenerantes não transformados (PARK et al., 1998). O resultado destes autores pode explicar a hipótese da regeneração de plantas quimeras do presente estudo, visto que o uso de 0,6 mg/L de PPT possa ter sido ineficiente para a seleção de plantas que passaram pelo processo de transformação, já que esta foi a menor concentração em que não houve regeneração de plantas.

Outras hipóteses também foram propostas para explicar a regeneração de plantas quimeras, como: 1) a seleção de células vegetais mutantes resistente ao agente seletivo; 2) tolerância não específica endógena das células vegetais ao agente seletivo; 3) proteção de células não transformadas, ao agente seletivo, pelas células transformadas que a circundam e 4) persistência da *A. tumefaciens* em tecidos infectados (DOMÍNGUEZ et al., 2004).

A primeira hipótese relatada por Domínguez et al. (2004) também foi observada por Cancado et al. (2009), que observaram que a sobrevivência ao agente seletivo de plantas não transformadas, pode ocorrer pelo surgimento de variações somaclonais (mutações) nestas plantas. No presente estudo, não foi possível afirmar que as plantas que resistiram ao agente seletivo eram mutantes, pois segundo Birch et al. (1997), ensaios de expressão do gene introduzido são necessários para tal afirmação.

A segunda hipótese, a qual sugere uma tolerância endógena das células vegetais ao agente seletivo, não foi considerada válida neste experimento. Esta hipótese foi negada porque no presente trabalho, além do controle total (calos que não passaram pelo processo de transformação), foi utilizado o controle infiltração, representado pelos calos que passaram por todo o processo de transformação porém não entraram em contato com a bactéria *A. tumefaciens*. Como as plantas deste controle não sobreviveram ao meio de seleção com o herbicida fosfinotricina, foi descartada a possibilidade de uma tolerância endógena das plantas

ao agente seletivo. Domínguez et al. (2004) também não consideraram esta hipótese. Pois de acordo com os autores, explantes controle que não foram inoculados com bactéria, ao serem cultivados com 100 mg/L de Canamicina não regeneraram plantas.

A terceira hipótese, que sugere a ocorrência de uma proteção de células não transformadas por células transformadas circundantes, chamada de “proteção-cruzada” por Park et al. (1998), também foi considerada como capaz de explicar a possível regeneração de quimeras neste estudo. Isto porque, no meio de seleção com o agente seletivo PPT a regeneração dos brotos de eucalipto ocorreu a partir dos calos que passaram pelo processo de transformação, e parte desse calo (camada superior) não se encontrava em contato direto com o agente seletivo presente no meio de cultura. Desta forma, é provável que algumas plantas regeneradas tenham vindo de uma mistura de células de calos transformadas e não transformadas, já que estas foram protegidas pela eficiente detoxificação pelas células transformadas circundantes.

No trabalho de Domínguez et al. (2004), muitas das plantas de citrus consideradas como quimeras ou escape surgiram próximas ou mesmo a partir de plantas transformadas, o que foi observado por meio da análise visual utilizando os genes repórteres *gusA* ( $\beta$ -glucuronidase) e *gfp* (*green fluorescent protein*). Chen et al. (2011) embora não conhecessem a exata razão da formação de plantas quimeras originadas após a transformação de *Lesquerella flendleri* com *A. tumefaciens*, também suspeitaram de uma eficiente proteção de células não transformadas por células transformadas, pelo motivo de escapes (plantas não transformadas) terem surgido próximas ou mesmo a partir de calos quimeras.

A quarta hipótese, que considera a persistência da *A. tumefaciens* em tecidos infectados não pode ser utilizada para explicar o surgimento de possíveis quimeras no presente estudo. Isto porque não houve um resultado conclusivo no gel de verificação de uma possível contaminação das plantas com a bactéria *A. tumefaciens* (resultado apresentado pelo gel com os *primers* Sm/Sp). Apesar disso, uma hipótese de que estas plantas poderiam não estar contaminadas por *A. tumefaciens* se apoia no fato do antibiótico Tioxin<sup>®</sup>, utilizado no presente trabalho, ter ação bactericida, eliminando toda a bactéria das plantas, e não apenas inibindo o crescimento delas como os antibióticos bacteriostáticos.

Domínguez et al. (2004), por outro lado, observaram a persistência de *A. tumefaciens* em explantes de citrus que passaram por transformação genética, depois de nove meses do co-cultivo, e associaram isto ao uso dos antibióticos cefotaxima e vancomocina utilizados para a eliminação da bactéria. Segundo estes autores a eliminação completa da bactéria foi mais difícil, devido a ação bacteriostática dos antibióticos utilizados.

Além destas hipóteses, Cancado et al. (2009) sugerem que a regeneração de plantas não transformadas que foram resistentes ao agente seletivo, podem ocorrer por meio da degradação do agente seletivo. Hipótese não considerada aqui, visto que análises de composição do meio de cultura deveriam ser realizadas para tal afirmação.

A não alteração do teor de celulose observado em plantas que passaram pelo processo de transformação genética em relação as plantas controle, também confirma a suspeita de possíveis plantas quimeras.

## 5 CONCLUSÃO

Diante dos resultados apresentados, sugere-se que as plantas de *E. grandis* x *E. urophylla* que passaram pela transformação genética são quimeras devido as inconsistências das PCRs e a alteração não significativa no teor de celulose entre os eventos que passaram pela transformação e a planta controle. Além disso, a regeneração das plantas quimeras é atribuída à concentração de PPT utilizada no meio de seleção e a proteção das células não transformadas pelas células transformadas que as circundavam.

## REFERÊNCIAS

- BALIEIRO, F. P. **Transformação genética de híbridos de urograndis**. 2013. 87 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.
- BATISTA, T. R. **Organogênese e embriogênese somática de híbrido de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla***. 2012. 74 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.
- BIRCH, R. G. Plant Transformation: Problems and Strategies for Practical Application. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 48, p. 297–326, 1997.
- BNDES. **Potencial de diversificação da indústria química brasileira Relatório 4 – Derivados de celulose**. 2014. Disponível em: <[www.bndes.gov.br/SiteBNDES/export/sites/default/bndes\\_pt/Galerias/Arquivos/produtos/download/aep\\_fep/chamada\\_publica\\_FEPprosp ec0311\\_Quimicos\\_Relat4\\_celulose.pdf](http://www.bndes.gov.br/SiteBNDES/export/sites/default/bndes_pt/Galerias/Arquivos/produtos/download/aep_fep/chamada_publica_FEPprosp ec0311_Quimicos_Relat4_celulose.pdf)> Acesso em: 02 out. 2018.
- CANCADO, G. M. A. et al. Plantas transgênicas. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 30, n. 253, p. 14-23, 2009
- CHEN, G. Q. Effective Reduction of Chimeric Tissue in Transgenics for the Stable Genetic Transformation of *Lesquerella fendleri*. **HortScience**, Virgínia, v. 46, n. 1, p. 86–90, 2011.
- CHRISTOU, P. Morphological description of transgenic soybean chimeras created by delivery, integration and expression of foreign DNA using electric discharge particle acceleration. **Annals of Botany**, Oxford, v. 66, p. 379–386, 1990.
- DOBLIN, M. S. et al. Cellulose biosynthesis in Plants: from genes to rosettes. **Plant Cell Physiology**, Oxford, v. 43, n.12, p. 1407-1420, 2002.
- DOMÍNGUEZ, A. et al. Characterization of regenerants obtained under selective conditions after *Agrobacterium*-mediated transformation of citrus explants reveals production of silenced and chimeric plants at unexpected high frequencies. **Molecular Breeding**, Berlim, v. 14, p. 171-183, 2004.
- FERREIRA, D. F. Sisvar 4.3 **Sistema de Análises Estatísticas**. Lavras: UFLA, 1999.
- GARTLAND, K.M.A. et al. Genetically modified trees: production, properties, and potential. **Journal of Arboriculture**, Illinois, v.29, n.5, p.259-266, 2003.
- IBÁ. **Indústria Brasileira de Árvores**. 2017. Disponível em: <[https://iba.org/images/shared/Biblioteca/IBA\\_RelatorioAnual2017.pdf](https://iba.org/images/shared/Biblioteca/IBA_RelatorioAnual2017.pdf)> Acesso em: 10 out. 2018.
- MEENTS, M. J.; WATANABE, Y.; SAMUELS, A. L. The cell biology of secondary cell wall biosynthesis. **Annals of Botany**, Oxford, p. 1-19, 2018.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Nova Jersey, v. 15 , p. 473 - 497,1962.

MURUGANANTHAM, M. et al. Efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of *Vigna mungo* using immature cotyledonary node explants and phosphinothricin as the selection agent. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, Berlim, v. 43, p. 550–557, 2007.

NEHRA, N. S. et al. Forest biotechnology: Innovative methods, emerging opportunities. **In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, Berlim, v. 41, p. 701-717, 2005.

PARK, S. H. et al. Cross-protection and selectable marker genes in plant transformation. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, Berlim, v. 34, p. 117-121, 1998.

PERSSON, S. et al. Identification of genes required for cellulose synthesis by regression analysis of public microarray data sets. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, DC, EUA, v. 102, p. 8633–8638, 2005.

REMADE. **Importância do Eucalipto para a Indústria de Celulose no Brasil**. 2002.

Disponível em: <[http://www.remade.com.br/br/revistadamadeira\\_materia.php?num=6&subject=Celulose&title=Import%20ncia%20do%20Eucalipto%20para%20a%20Ind%20FAstria%20de%20Celulose%20no%20Brasil](http://www.remade.com.br/br/revistadamadeira_materia.php?num=6&subject=Celulose&title=Import%20ncia%20do%20Eucalipto%20para%20a%20Ind%20FAstria%20de%20Celulose%20no%20Brasil)> Acesso em: 28 nov. 2018.

SELVARAJ, N. et al. Evaluation of green fluorescent protein as a reporter gene and phosphinothricin as the selective agent for achieving a higher recovery of transformants in cucumber (*Cucumis sativus* L. cv. Poinsett76) via *Agrobacterium tumefaciens*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, Tamil Nadu, v.46, n.4, p.329-337. 2010.

TANG, X. et al. Poplar PdMYB221 is involved in the direct and indirect regulation of secondary wall biosynthesis during wood formation. **Scientific Reports**, Londres, v. 12, n. 12240, p. 1-14, 2015.

TORRE, F. de la, et al. Genetic transformation of *Eucalyptus globulus* using the vascular specific EgCCR as an alternative to the constitutive CaMV35S promoter. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Nova Iorque, v.117, p.77–84, 2014.

## **ARTIGO DE REVISÃO BIBLIOGRÁFICA E SISTEMÁTICA - TISs**

O artigo de revisão bibliográfica e sistemática apresentado a seguir, intitulado *Temporary Immersion System for Micropropagation of Tree Species: a Bibliographic and Systematic Review*, foi escrito com o objetivo de realizar uma revisão de literatura sobre o uso dos Sistemas de Imersão Temporária (TISs) na micropropagação de espécies arbóreas, a fim de identificar os principais grupos que estão publicando nesta área, os *journals* com maior aceite deste tipo de trabalho, os parâmetros mais estudados em trabalhos de TISs e as possíveis lacunas que ainda necessitam serem elucidadas. Este estudo servirá como base para a realização de futuros trabalhos empíricos.

Este artigo foi publicado em 10 de setembro de 2018 no *journal Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, com fator de impacto 0,648 e indexado em plataformas como ISI WoS-SCIE (Clarivate Analytics) e ProQuest.

Available online: [www.notulaebotanicae.ro](http://www.notulaebotanicae.ro)

Print ISSN 0255-965X; Electronic 1842-4309

Not Bot Horti Agrobo, 2019, 47(2):269-277. DOI:10.15835/nbha47211305



Review Article

## Temporary Immersion System for Micropropagation of Tree Species: a Bibliographic and Systematic Review

Lara S.O. CARVALHO<sup>1\*</sup>, Elif A. OZUDOGRU<sup>2</sup>, Maurizio LAMBARDI<sup>3</sup>,  
Luciano V. PAIVA<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Federal University of Lavras, Biology Department, Lavras, PO Box 3037, Brazil; [lcavalho470@gmail.com](mailto:lcavalho470@gmail.com) (\*corresponding author)

<sup>2</sup>Biyofidan Plant Tissue Culture Laboratory, Yalova, Turkey; [elifaylinozudogru@yahoo.it](mailto:elifaylinozudogru@yahoo.it)

<sup>3</sup>IVALSA / Istituto per la Valorizzazione del Legno e delle Specie Arboree, CNR, Sesto Fiorentino, Florence, Italy; [lambardi@ivalsa.cnr.it](mailto:lambardi@ivalsa.cnr.it)

<sup>4</sup>Federal University of Lavras, Chemistry Department, Lavras, PO Box 3037, Brazil; [luciano@dqf.ufla.br](mailto:luciano@dqf.ufla.br)

### Abstract

This paper was characterized by a bibliometric and systematic review on the database ISI Web of Science, aiming to provide an update of the main points addressed regarding the Temporary Immersion Systems (TIS) for micropropagation of tree species. It was pointed out that the frequency and time of immersion were one of the main parameters studied in the papers and 35% these papers worked with eucalyptus species. The main problem reported in the papers was the hyperhydricity, but it was overcome via procedures such as: a) air injection into the system, b) increasing the immersion intervals and decreasing the immersion time and c) decreasing concentration of cytokinin. Most papers reported that TIS produced plants that were more successful in surviving the *ex-vitro* acclimation stage than those produced on semi-solid media or continuous immersion systems. Few studies compared different types of temporary immersion bioreactors on micropropagation of plants and within the established criteria, papers with TIS tree species represented only 15% of the total. This system has presented promising results for most of the tree species, and although some gaps have been identified and few are the works with tree species, this process has been taking an increasingly larger space in the propagation of plants.

**Keywords:** eucalyptus; hyperhydricity; immersion frequency; micropropagation

### Introduction

Micropropagation of plants *in vitro* using liquid culture media are considered to be more effective than semi-solid culture media because, in the liquid systems, plants have greater accessibility to the medium components, allowing greater gains in biomass and time reduction for plants propagation; moreover, there are ease of handling, possibility to scale and automate (which reduces labor costs), besides not having expenses with gelling agents – one major component increasing the cost of propagation in commercial laboratories (Dutra *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2011b; Welander *et al.*, 2014; Businge *et al.*, 2017).

Among the systems that use the liquid medium, the Temporary Immersion System (TIS), allowing the temporary contact between the plants and the liquid medium, presents advantages such as to avoid continuous immersion, which adversely affects growth and morphogenesis of plants, and provide adequate oxygen transfer to the culture (Etienne and Berthouly, 2002).

Tree species of great economic interests need efficient multiplication at the *in vitro* stage to obtain sufficient numbers of plants for production purposes, and although many of them already have well-established propagation systems, the liquid culture using TIS is an alternative method that has shown advantages for some of these species when compared to the conventional method of micropropagation, which uses semi-solid medium (Akdemir *et al.*, 2014; Vilchez and Albany, 2015; Businge *et al.*, 2017).

As for the aforementioned, this study aims at performing a bibliometric and systematic review of the literature in the sector, focusing the attention to the main contributions related to liquid culture in TIS of tree species.

### Temporary Immersion System (TIS): An Overview

Liquid culture in TIS is an automated system, designed for intensive and often scaled-up cultures, able to monitor and control micro-environmental conditions, improving the supply of nutrients and gas transfers, in order to reduce

Received: 20 Jun 2018. Received in revised form: 10 Sep 2018. Accepted: 10 Sep 2018. Published online: 10 Sep 2018.

270

physiological disorders, such as hyperhydricity and, thus, preserve the morphological integrity of micropropagated cultures. This system provides an *in vitro* environment for plants tissue and organ cultures, where the cultivated propagules are immersed for a certain period into a liquid medium and then exposed to a gaseous environment (Georgiev *et al.*, 2014). They are semi-automated or fully-automated cultivation systems, based on alternating cycles of temporary immersion of the cultured plant tissue into the liquid medium followed by draining and exposing the plant tissue to a gaseous environment.

The immersion period is usually shorter (a few minutes), whereas the air exposure period is prolonged (several hours). The precise control of the frequencies and time of immersion may significantly reduce the hyperhydricity of the plant tissue by creating conditions for optimal humidity and nutrient supply (Albarrán *et al.*, 2005; Georgiev *et al.*, 2014).

In the TIS the direct exposure of the plant tissue to the gaseous environment facilitates the interphase oxygen transport from the gas to the cultured cells, which doesn't occur in submerged cultures, where the interphase oxygen transport faces resistance in a few boundary layers [gas-liquid and liquid-solid interfaces]. In this way the improved oxygen transport contributes to better gas exchange, reducing oxygen limitations and, thus, lowering the occurrence of physiological disorders such as asphyxia and hyperhydricity (Georgiev *et al.*, 2014).

The existent types of TIS differ in relation to the size of the container, type of culture support, presence of computerized immersion control or of a simple timer, use of a peristaltic pump or an air pump or mechanical motion of the container to displace the liquid, recycling or not of the medium, and separation or incorporation of the medium tank with the culture container (Etienne and Berthouly, 2002).

### Bibliometric and Systematic Review

Literature review papers are “a form of research that uses sources of bibliographic or electronic information to obtain search results from other authors, in order to theoretically supports a particular topic” (Botelho *et al.*, 2011).

In bibliometric reviews, there is the quantification of publications related to a topic under study, that is, frequency of publications over the years, authors, journals, countries, and other important data. In contrast, systematic reviews are in-depth analysis that deals with a particular research issue by using detailed, explicit and systematic methods to raise, identify, select, interpret, collect and analyze references (Botelho *et al.*, 2011).

According to Whittemor and Knafl (2005), there are basically four types of systematic literature review: meta-analysis (a combination of results of studies with statistical formulas, targeting analysis, comparisons and generating new results); systematic (based on scientific research strategies, it limits the scope of selection of papers, synthesizes studies and evaluates them critically); qualitative (systematization and synthesis of qualitative studies' findings, transforming them into tools to build new theories), and integrative (reviews the past empirical and theoretical literature, presenting the state of the art on a theme, especially for results analysis and synthesis of previous research contributions and gaps). In this particular study, a bibliometric review, followed by a systematic literature review, was selected and carried out.

### Materials and Methods

This study is characterized as a descriptive research, drawn by a bibliometric and systematic review focusing on investigating the main parameters related to the study of TIS in tree species. Fig. 1 highlights the research design.

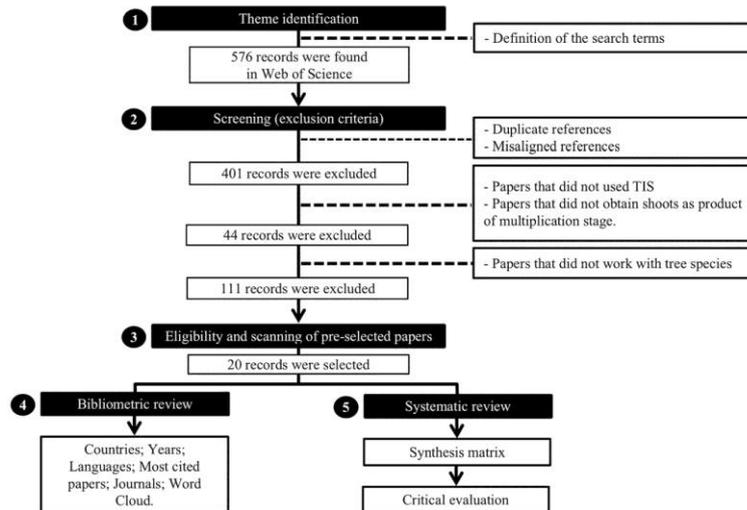


Fig. 1. Flow diagram of the study selection process for the bibliometric and systematic review. Source: Prepared by the authors

#### Explanation of steps

- **Theme identification (step 1):** the papers were searched on the Web of Science (WoS) database, with all years included, using the Boolean operator "AND" and were selected by the following terms in the title, abstract and keywords of the papers: "temporary AND immersion AND bioreactor AND system AND micropropagation"; "temporary AND immersion AND system AND micropropagation"; "temporary AND immersion AND bioreactor AND micropropagation"; "bioreactor AND system AND micropropagation"; "bioreactor AND micropropagation". A total of 576 were found, considering only scientific papers (not including books and conference proceedings). It is worth clarifying that the Boolean operator 'AND' was used to ensure that only all words appeared together. The terms were searched only in singular, because it was observed that such search also yielded terms in plural as results.
- **Screening (exclusion criteria) (step 2):** In all the papers, titles and abstracts were analyzed in order to allow further filtering. Three refining filters were applied, excluding: 1<sup>o</sup>) a) duplicate references – identified more than once in different sources, b) non-related references to the research problem or just tangent the themes of interest. As a consequence, of the 576 papers, 401 were excluded. 2<sup>o</sup>) papers that didn't use TIS and papers that didn't obtain shoots as product of the multiplication stage; of the remaining 175 papers, 44 were excluded. 3<sup>o</sup>) papers that didn't work with tree species; of the remaining 131 papers, 111 were excluded.
- **Eligibility and scanning of pre-selected papers (step 3):** it was reached 20 papers for research and analysis. These papers were pre-selected for in-depth reading and analysis.

- **Overall analysis of the papers (bibliometric review) (step 4):** by using the metadata generated by Web of Science and the scientometric software CiteSpace (Chen, 2006), the following points were analyzed: countries that published and evolution of publications over the years, publications languages, most cited paper, the frequency of journals where the papers were published, and keywords recurrence in a Word Cloud.
- **Systematic review (step 5):** the main points of each document were addressed in a table (synthesis matrix) which included: studied species; initial explant; TIS used; best immersion frequency; biological efficacy in TIS comparing to SS / CIS (Semi-Solid / Continuous Immersion Systems) systems; hyperhydricity; *ex-vitro* acclimation (survival) and author's name. In addition, the main gaps, main contributions and future proposals were also addressed.

#### Results and Discussion

##### Bibliometric review

Fig. 2 presents the countries and publication's years, in which the larger the font letter (and the bigger the circle next to the country's name) the most publications the country has. Brazil ranked in first as country that publish the most, with 4 papers, followed by South Korea and Spain, with 3 papers each and after Sweden and Turkey, with 2 papers. The other countries published only one paper. As for the language of publication, there is a large predominance of papers in English (75%). The curve that links some of the countries means that a given paper of one country was cited by another given paper from a different country. Moreover, it is possible to observe different sets of colors in the countries' circles, which represent the publication years of the papers (such colors range in a spectrum depicted in the header of Fig. 2, where cold colors represent the papers with older publications and the warm colors those recently published).

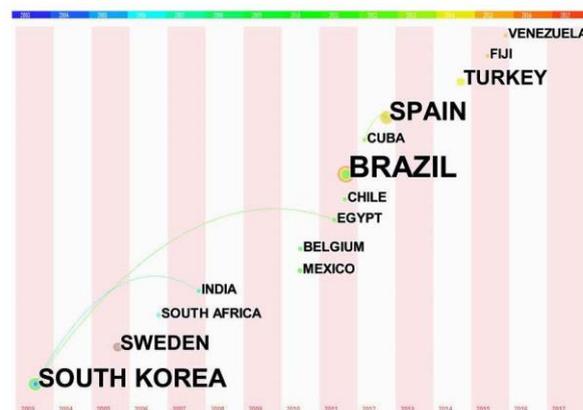


Fig. 2. Countries that published and the evolution of publications over the years. Source: Prepared by the authors on CiteSpace based on Web of Science metadata



Table 1. Summary of micropropagation processes using temporary immersion systems

Species (Common Name)	Initial explant	Temporary Immersion System	Best immersion frequency	Comparison TIS vs SS/CIS <sup>(a)</sup>	Hyperhydricity	Ex-vitro acclimation (survival)	Citation
<i>Pistacia</i> spp. (pistachio)	Shoot tips and nodal buds	RITA*	16 h/24 min	PR: 4.04 (/SS; <i>P. vera</i> ), SL: 1.93 (/SS; <i>P. khinjuk</i> )	No	Not reported	Akdemir et al., 2014
<i>E. grandis</i> XE <i>urophylla</i> ; <i>Betula</i> spp.	<i>Eucalyptus</i> (small shoot clumps); <i>Betula</i> spp. (stem of 2-3 cm)	TIB (Temporary Immersion Bioreactor) – new model of Twin flask	1 h/1 min	PR: 5.75 (/SS; <i>Eucalyptus</i> ), 1.75 (/SS; <i>B. pendula</i> ), FW: TIS > SS	Partial ( <i>Betula pendula</i> )	100%	Businge et al., 2017
<i>Malus domestica</i> Borkh. (apple M.9 EMLA)	Nodal segments	Ebb & Flood (Air lift BTBE and air lift Column)	6 h/15 min	PR: 0.87 (/SS), SL: 0.94 (/SS), FW: 0.79 (/SS)	2.24%	> 90%	Chakrabarty et al., 2003
<i>Malus domestica</i> Borkh. (apple M.9 EMLA)	Single-node cuttings with a single leaf	BTBB (ballon-type bubble bioreactor)	6 h/15 min	PR: 0.64 (/CIS), SL: 1.03 (/CIS), FW: 0.86 (/CIS), DW: 1.33 (/CIS)	17.7%	Not reported	Chakrabarty et al., 2007
<i>Eucalyptus globulus</i>	Microshoots of 1.5 cm	BIT (Escalona et al., 1999)	12 h/2 min	PR: 43.2 <sup>(b)</sup>	50.4%	Not reported	González et al., 2011
<i>Eucalyptus</i> spp.	Nodal shoots	RITA*	10 min/30 s	PR: 1.58 (/SS)	Not reported	91%	Hajri et al., 2006
<i>Kalopanax septemlobus</i> (ceceatalia)	Somatic embryos at the early complementary stages	Modified column type bioreactor	4 h/30 min	PR: 2.9 (/CIS), 1.18 (/SS)	Not reported	100%	Kim et al., 2011
<i>Eucalyptus camaldulensis</i>	Explants of 1 cm length and two buds	Two glass bottles (culture medium and explants)	2 h/15 min	PR: 0.74 (/CIS), SL: 1 (/CIS)	No	76%	Mendonça et al., 2016
<i>Eucalyptus grandis</i> x <i>Eucalyptus urophylla</i>	Apical shoots; clusters of shoots	RITA*	2 h/8 s	PR: 12.7, FW: -0.4 g <sup>(b)</sup>	-10%	Not reported	Oliveira et al., 2011a
<i>Eucalyptus grandis</i> x <i>Eucalyptus urophylla</i>	Apical shoots	RITA*	2 h/8 s	PR: -2 (/SS), FW: 2.5 (/SS)	-100%	Not reported	Oliveira et al., 2011b
<i>Eucalyptus grandis</i> x <i>Eucalyptus urophylla</i>	Apical shoots	RITA*	2 h/8 s	PR: 14.37, FW: 0.49 <sup>(b)</sup>	65.9%	Not reported	Oliveira et al., 2014
<i>Cedrela odorata</i> L. (Spanish red cedar; cigar box cedar)	Adventitious shoots	BioMINT*	6 h/1 min	LS: 3.67 (/SS), DW: 10 (/SS), LR: 3 (/SS)	Not reported	98%	Peña-Ramírez et al., 2010
<i>Tectona grandis</i> L. (teak)	Apical shoots with two pairs of fully expanded leaves	Based on the two-vessel system described by Escalona et al. (1999)	6 h/40 s	PR: 2.13 (/SS), LS: 1.19 (/SS)	2.6%	80%	Quiala et al., 2012
<i>Artocarpus alatus</i> (breadfruit)	Shoots of 30 mm	Bioreactor tilting immersion liquid system (Caisson Laboratories)	Not determined	Not determined	No	100%	Shandil and Tuis, 2015
<i>Pistacia khinjuk</i> (khinjuk pistachio)	Shoot tips and nodal buds	RITA*	16 h/10 min	PR: 2.24 (/SS), LS: 0.63 (/SS)	8%	Not reported	Tilkat et al., 2014
<i>Castanea sativa</i> Mill. (chestnut)	Apical and axillary explants	Twin flask system	24 h/60 min	LS: TIS > SS	Partial	Not reported	Troch et al., 2010
<i>Castanea</i> spp. (chestnut); <i>Salix viminalis</i> (basket willow)	Apical medium or basal segments attached to the basal callus	Twin flask system designed by TRAGSA, RITA* and Plantform*	4 or 8 h/3 min	PR: 1.16 (/SS; Willow, RITA* and Plantform*), LS: 1.54 (/SS; Chestnut, Plantform*)	No (willow); Partial (chestnut)	100%	Vidal et al., 2015a
<i>Castanea sativa</i> (chestnut)	Nodal explants	RITA*; Plantform*; twin flask system	4 or 8 h/1 or 3 min	PR: TIS ≥ SS	No	~40 to 80%	Vidal et al., 2015b
<i>Psidium guajava</i> L. (guava)	Embryos in the torpedo and complementary stages	RITA*	12 h/1 or 2 min	PR: 2.99 (/SS)	Not reported	Not reported	Vilchez and Albany, 2015
<i>Malus domestica</i> Borkh. (apple MD6)	Shoots	RITA*	1:30 h/2 min	PR: 8.1, LS: 25.8 <sup>(b)</sup>	No	100%	Zhu et al., 2005

<sup>(a)</sup>Values represent the ratio with SS/CIS results. Only best results of TIS is considered. SS = Semi Solid; CIS = Continuous Immersion System; PR = Proliferation Rate; SL = Shoot Length; FW = Fresh Weight; DW = Dry Weight.

<sup>(b)</sup>Means values in TIS (not compared with SS or CIS)

274

#### Initial explant

The initial explants that were used to start a liquid culture in TIS were shoot tips, nodal buds, nodal segments, apical, medium or basal segments with basal callus, shoots and somatic embryos in the torpedo or cotyledonary phase.

In different *Castanea sativa* clones it was observed that basal explants with callus produced more and larger shoots than apical explants and nodal segments (Vidal et al., 2015b). This greater proliferation of shoots in callus explants may have occurred because unorganized callus cells may have produced adventitious buds that grow and develop in new aerial parts (Grattapaglia and Machado, 1998).

Akdemir et al. (2014) observed a proliferation of multiple shoots from nodal buds of *Pistacia vera* 'Siirt' when compared to shoot tips, associating this fact to a breakdown of apical dominance and growth stimulus of lateral shoots. On the other hand, in *Pistacia khinjuk*, the highest shoot forming capacity index (3.12) and the minimum hyperhydration rate (8%) were obtained in shoot tips with an immersion frequency of 10 min every 16 h (Tilkat et al., 2014).

#### Temporary Immersion System (TIS)

In the reports, RITA<sup>®</sup> was the most used TIS system, it was adopted in 45% of the studies. This predominance can be explained by the fact that RITA<sup>®</sup> was one of the first TIS to be proposed (Alvard et al., 1993), suggesting a greater access of researchers to this system, and it was the first apparatus to receive commercial interest by the French company Vitropic (Lambardi, 2012). RITA<sup>®</sup> is composed of a single container, divided into two compartments through a support of sufficient relative humidity, which separates the propagules from the liquid medium (Georgiev et al., 2014).

In contrast, it was observed that the system Plantform<sup>®</sup> was only used in two studies, which can be explained by the fact that such system has been recently developed (www.plantform.se). Plantform<sup>®</sup> presents advantages that overcome problems of older bioreactors, such as: greater interior surface area for the cultures growth, suitable size for handling, possibility of gas exchange, and the possibility to place the boxes one over the other for saving culture space, which is very attractive for large scale production (Welander et al., 2014). Also worth of mention is that the cost of implementing the Plantform<sup>®</sup> system is about half of the cost for RITA<sup>®</sup> (Lambardi, 2012).

#### Frequency and time of immersion

The frequency and time of immersion were one of the main parameters studied, appearing in 40% of the papers. According to Etienne and Berthouly (2002), the frequency and time of immersion are the most decisive parameters for the efficiency of the system, since they determine the nutrients absorption and the control of hyperhydricity. Although such parameter varies considerably (probably due to the great variety of existing species, different micropropagation processes and different immersion systems used), a great part of the studies reported that in smaller immersion intervals there are greater growth in fresh mass and number of shoots, although hyperhydricity is sometimes more severe (Oliveira et al., 2014).

In pistachio, for example, a 16 minutes immersion every 16 hours reduced vitrification and improved proliferation of shoots, when compared to a 16 minutes immersion every 8 hours (Akdemir et al., 2014). Tilkat et al. (2014) observed that repeated trials for immersion frequencies at short time intervals (10 min/2 h, 10 min/4 h) showed hyperhydrated explants up to 100%, while in immersions with relatively longer time intervals (10 min/20 h) this problem was not observed.

#### Biological efficacy in TIS in comparison to SS and CIS systems

According to Etienne and Berthouly (2002), when envisaging commercial use of automated TISs, it is important to take into account growth measurements, production and quality of the cultured material, as well as to compare them to the material produced by conventional culture systems. Most of the articles studied here, showed a better efficacy of TIS in relation to SS. Regarding CIS, it was observed in most of the studies that the highest values of growth measures occurred in CIS instead of TIS, but the quality of TIS material generally was higher than that of CIS material.

Akdemir et al. (2014), working with pistachio, obtained in RITA<sup>®</sup> up to 4.4 higher number of shoots, and up to 1.93 longer shoot length than in SS medium, using the optimized parameters (explant type, frequency and immersion time and growth regulators). Businge et al. (2017) evaluated a new model of TIS bioreactor, which consists of a culture vessel and a bottle for holding liquid medium that can be both autoclaved. The culture vessels are placed on shelves situated one level above the medium to facilitate return flow of the medium for the bottle when the pump is switched off. Using this new system the authors obtained a multiplication rate that was 5.75 times greater than the culture in SS with the hybrid *E. grandis* × *E. wrophylla*, and 1.75 times greater with *Betula pendula*. On the other hand, for *Betula pubescens* an increase of 1.5 times in the multiplication rate was observed when the plants were grown in the semi-solid medium and the fresh weight displayed similar patterns to those observed for multiplication rate.

Working with the apple rootstock 'M9 EMLA', Chakrabarty et al. (2003) demonstrated that although the multiplication rate was higher in CIS, in ebb and flood system (a modification of the Twin-Flasks systems), hyperhydricity was reduced. According to the same authors, the higher rate of multiplication in liquid medium can be explained by the fact that, in this system, there is a larger surface area for the absorption of cytokinins which, as a consequence, inhibits the apical dominance of shoots and increases the formation of axillary shoots. Moreover, in the liquid medium the components are taken up by plants with a better translocation through leaves via stomata and aqueous pores (Schöher, 2006), and are transferred to the growing regions over a shorter distance (De Klerk and Ter Brugge, 2011). Uptake of medium ingredients and plant growth regulators over the whole plant surface improves the growth of plantlets in liquid medium with TIS (Preil, 2005; Quiala et al., 2006; Akdemir et al., 2014).

### Hyperhydricity

Hyperhydricity – phenomenon whereby shoots become glassy and transparent, with swollen, brittle leaves and stems – has been reported as one of the major problems affecting woody crops in liquid culture systems (Le Roux and Van Staden, 1991; Chakrabarty et al., 2003).

Although hyperhydricity has been a problem reported in 80% of TIS papers, some solutions have shown to reduce and even eliminate this phenomenon by the use of some procedures, such as the application of air ventilation into the system, the increment of immersion intervals and decrease of immersion times, and the decrease of cytokinin concentration.

Chakrabarty et al. (2003), comparing the culture of apple rootstock 'M9 EMLA' in the Ebb and Flood system with and without air exchanges inside the bioreactor chamber, observed a reduction of more than 50% in hyperhydricity in the presence of air. In corroboration to this observation, Etienne and Berthouly (2002) stated that, to achieve effectiveness in TIS, it's necessary to combine ventilation of the plant tissues with intermittent contact between the entire surface of the tissue and the liquid medium.

In *Pistachio vera* 'Siirt' the increase of the immersion frequency from 8 hours to 16 and 24 hours not only increased the percentage of proliferation (85 and 88%, respectively), but also prevented the hyperhydricity of the shoots (0%) (Akdemir et al., 2014).

González et al. (2011) observed that in *Eucalyptus globulus* the hyperhydration of the shoots increases with the simultaneous increase of macronutrients concentration (25 to 100%) and immersion time (1 to 3 min), and also evidenced this phenomenon with the increase of immersion frequency (6 to 48 h).

The frequency and the immersion time are the main factors that influence the proliferation and hyperhydration of shoots, and this physiological disorder can occur by the formation of an aqueous film around the tissues that may interfere with gas exchanges between the outer tissue and the cell surface, since gas diffusion rates are about 10.000 times slower in water than in air (González et al., 2011; Jackson, 2003), a fact that corroborates the results of Chakrabarty et al. (2003), reported above.

Another factor pointed out in the articles as a cause of hyperhydricity was the high concentration of cytokinins in TIS, such as BA. According to Ivanova and Van Staden (2011), higher concentrations of cytokinins can increase the occurrence of vitrification in many species due to their physiological influences and in the development of plants. In *Tectona grandis* L. it was observed the presence of hyperhydric shoots in the highest concentration of BA used (6.6 µM), which impaired shoots proliferation in TIS (Quiala et al., 2012). In *E. globulus*, the highest percentage of hyperhydration (61.9%) occurred in the treatment with 4.4 µM BA when compared to treatments with 2.2 (51.4%) and without BA (45.3%) (González et al., 2011). In addition to higher concentration of cytokinins in culture medium, it should be taken into account that prolonged exposure times to BA can also lead to a physiological depletion of the material, thus reducing the rate of shoot proliferation in successive subcultures.

### Ex-vitro acclimation (survival)

A high level of plant acclimatization was reported in all the studies which acclimated plants derived from liquid culture in TIS. According to Etienne and Berthouly (2002), enhanced acclimatization of the plant material produced in bioreactors has been claimed as one of the main advantages of TIS.

*Kalopanax septemlobus* plantlets grown in CIS exhibited a lower survival rate (75.8%) when compared to those grown in TIS bioreactors (100%) (Kim et al., 2011). Plantlets from bioreactors had 100% average survival in the screenhouse for Samoan *ma'afala* and Fijian *kogo*, two breadfruit (*Artocarpus alibis*) varieties, whilst 83% survival was observed for plantlets from SS systems (Shandil and Tuia, 2015). It is noteworthy that, as reported by Businge et al. (2017), plants of *B. pendula* that presented hyperhydric symptoms following the culture in TIS, developed healthy and morphologically normal plants when acclimated in *ex-vitro* conditions. The same was observed by Quiala et al. (2012) in teak plants grown in 4.44 µM BA, which presented morpho-physiological disorders during the multiplication stage in TIS but displayed good development and had a good survival rate (80%) during acclimatization, suggesting the possibility for the plantlets to revert into a normal morpho-physiological state after transfer to *ex-vitro* conditions.

It has been reported that plant grown in bioreactors systems are very similar to plants grown in *ex-vitro* conditions, providing a higher survival rate (Etienne and Berthouly, 2002). Apple rootstock 'M9 EMLA' shoots produced in TIS showed higher photosynthetic rate, maximum quantum yield of photosystem-II and slow but steady rate of nutrient absorption, indicating a higher rate of photomixotrophic metabolism (Chakrabarty et al., 2007).

### Conclusions

Temporary Immersion Systems have shown positive effects on shoot proliferation of many tree species. Plant growth and proliferation rates are generally better than those obtained on semisolid medium and generally present better quality than plants developed in continuous immersion system. In addition, excellent results have been obtained during the acclimatization of plants from TIS.

In the screening of articles, it was observed that from the total number of papers that worked with TIS and obtained shoots as products of the multiplication stage, only 15% were of tree species, which shows a scarcity of the use of this system in these species. This fact may be related to the hyperhydricity and "recalcitrancy" to classical micropropagation that are main problems affecting woody species, which can discourage the use of this TIS in such species. On the other hand, the interest in this technique is increasing in recent years, as it can be a solution to the problem related to the high content of phenols of such species that, in turn, creates great problems of tissue and medium oxidation, reducing drastically proliferation rates.

Hyperhydricity has always been considered the main problem affecting the permanent culture in liquid medium. Reports on the use of liquid culture in TIS show that it is possible to circumvent or, at least, greatly reduce this

276

problem by controlling the frequency and immersion time, a great point in favor of TIS culture.

One research limitation of this particular study is indeed the small number of papers that compared the efficacy of more than one bioreactor as cultivation system. Of a total of 20 articles only 2 compared more than one bioreactor system (Vidal *et al.*, 2015a; Vidal *et al.*, 2015b). Since the work of Harris and Mason (1983), several TISs have been developed and the interest in this culture technique has progressively increased and shown promising results when compared to the traditional micropropagation system in semi-solid medium. In this way, it is fundamental not only to compare TIS with micropropagation in semi-solid systems, but also to compare different types of TIS and immersion cycles, in order to select best equipment and protocols for each species.

Another point to be taken into account is the large number of works with the RITA® bioreactor, a consequence of the fact that this bioreactor was the first exploited at the commercial level. Today, other bioreactors are available, commercially or by direct contact with those who developed them. They are often very promising, presenting innovative solutions at lower costs. Practical research should move towards the test of such devices with a broad range of species.

TIS can greatly contribute to reduce production costs, in terms of labor, gelling agent, growing time and shelf area. In addition to this fundamental advantage at commercial level, most of the papers analyzed here showed a high survival rate of plants from TIS during ex-vitro acclimatization, a very important fact when working with tree species, since losses during the acclimatization stage are considered one of the main costs of the micropropagation process as a whole.

#### Acknowledgements

The authors are grateful to Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and to CNR-IVALSA for the financial support for conducting this research.

#### Conflicts of Interest

The authors declare that there are no conflicts of interest related to this article.

#### References

- Akdemir H, Süzer V, Onay A, Tilkat E, Ersali Y, Çiftçi YO (2014). Micropropagation of the pistachio and its rootstocks by temporary immersion system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 117:65-76.
- Albarán J, Bertrand B, Lartaud M, Etienne H (2005). Cycle characteristics in a temporary immersion bioreactor affect regeneration, morphology, water and mineral status of coffee (*Coffea arabica*) somatic embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 81:27-36.
- Alvard D, Côté F, Teisson C (1993). Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation. Effects of temporary immersion of explants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 32:55-60.
- Bertola A (2014). "Eucalipto: Verdades e Mentiras" ["Eucalyptus: Truths and Lies"]. Retrieved 2017 October 23 from [http://www.painelflorestal.com.br/base/www.painelflorestal.com.br/media/attachments/43/43/541b3e9e487d6724141e01f535f443560e2a9ddb5ef2\\_eucalipto-verdades-e-mentiras.pdf](http://www.painelflorestal.com.br/base/www.painelflorestal.com.br/media/attachments/43/43/541b3e9e487d6724141e01f535f443560e2a9ddb5ef2_eucalipto-verdades-e-mentiras.pdf).
- Boelho LLR, Cunha CCA, Macedo M (2011). O método da revisão integrativa nos estudos organizacionais [The integrative review method in organizational studies]. *Gestão e Sociedade* 5(11):121-136.
- Businge E, Trifonova A, Schneider C, Rödel P, Egertsdotter U (2017). Evaluation of a new temporary immersion bioreactor system for micropropagation of cultivars of eucalyptus, birch and fir. *Forests* 8(196):1-9.
- Castro D, González J (2002). Eucalyptus (*Eucalyptus grandis* Hill. ex Maiden.) en el sistema de inmersión temporal [Eucalyptus (*Eucalyptus grandis* Hill. ex Maiden.) in the temporary immersion system]. *Agricultura Técnica* 62(1):68-78.
- Chakrabarty D, Hahn EJ, Yoon YJ, Paek KY (2003). Micropropagation of apple rootstock M9 EMLA using bioreactor. *Horticultural, Science and Biotechnology* 78(5):605-609.
- Chakrabarty D, Dewir YH, Hahn EJ, Dara SK, Paek KY (2007). The dynamics of nutrient utilization and growth of apple root stock 'M9 EMLA' in temporary versus continuous immersion bioreactors. *Plant Growth Regulation* 51:11-19.
- Chen C (2006). CiteSpace II: Detecting and visualizing emerging trends and transient patterns in scientific literature. *Journal of the American Society for Information Science and Technology* 57(3):359-377.
- De Klerk GJ, Ter Brugge J (2011). Micropropagation of dahlia in static liquid medium using slow-release tools of medium ingredients. *Scientia Horticulturae* 127:542-547.
- Dutra LF, Wendling I, Brondani GE (2009). A micropropagação de eucalipto [The micropropagation of eucalyptus]. *Pesquisa Florestal Brasileira* 58:49-59.
- Etienne H, Berthouly M (2002). Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 69:215-231.
- Georgiev V, Schumann A, Pavlov A, Bley T (2014). Temporary immersion systems in plant biotechnology. *Engineering in Life Sciences* 14:607-621.
- González R, Rios D, Avilés F, Sánchez-Olate M (2011). Multiplicación *in vitro* de *Eucalyptus globulus* mediante sistema de inmersión temporal [In vitro multiplication of *Eucalyptus globulus* by a temporary immersion system]. *Bosque* 32(2):147-154.
- Graatpaglia D, Machado MA (1998). Micropropagação. In: Torres AC, Caldas LC, Buso JA (Eds). *Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas EMBRAPA-CBAB*, Brasília pp 183-260.
- Hajari E, Watt MP, Mycock DJ, McAlister B (2006). Plant regeneration from induced callus of improved Eucalyptus clones. *South African Journal of Botany* 72:195-201.
- Harris RE, Mason EBB (1983). Two machines for *in vitro* propagation of plants in liquid media. *Canadian Journal of Plant Science* 63(1):311-316.
- IBÁ (2017). Indústria Brasileira de Árvores [Brazilian Tree Industry]. Retrieved 2017 October 28 from [http://iba.org/images/shared/Biblioteca/IBA\\_RelatorioAnual2017.pdf](http://iba.org/images/shared/Biblioteca/IBA_RelatorioAnual2017.pdf).

- Ivanova M, Van Staden J (2011). Influence of gelling agent and cytokinins on the control of hyperhydricity in *Aloe polyphylla*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 104:13-21.
- Jackson MB (2003). Aeration stress in plant tissue cultures. Bulgarian Journal of Plant Physiology XXVIX(3-4):96-105.
- Kim SJ, Dewir YH, Moon HK (2011). Large-scale plantlets conversion from cotyledonary somatic embryos of *Kalopanax septemlobus* tree using bioreactor cultures. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology 20(2):241-248.
- Lambardi M (2012). Micropropagazione in coltura liquida con sistema ad immersione temporanea [Micropropagation in liquid culture with temporary immersion system]. Rivista di Frutticoltura e di Ortofrutticoltura 12:32-38.
- Le Roux JJ, Van Staden J (1991). Micropropagation and tissue culture of Eucalyptus - A review. Tree Physiology 9:435-77.
- McAlister B, Finnie J, Watt MP, Blakeway F (2005). Use of temporary immersion bioreactor system (RITA<sup>®</sup>) for production of commercial *Eucalyptus* clones in Mondi Forest (SA). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 81(3):347-358.
- Mendonça EG, Stein VC, Carvalho HH de, Santos BR, Beijo LA, Paiva LV (2016). The use of continuous, temporary immersion bioreactor system and semisolid culture medium for the production of *Eucalyptus camaldulensis* clones. Ciência Florestal 26(4):1211-1224.
- Oliveira ML de, Xavier A, Filho RMP, Reis JP dos (2014). Efeito do intervalo de imersão e de injeção de ar na multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus grandis* × *Eucalyptus urophylla* em biorreator de imersão temporária [Effect of the immersion interval and air injection on *in vitro* multiplication of *Eucalyptus grandis* × *Eucalyptus urophylla* in temporary immersion bioreactor]. Ciência Florestal 24(1):37-45.
- Oliveira ML de, Xavier A, Filho RMP, Otoni WC, Teixeira JB (2011a). Efeitos do meio de cultura e da relação BAP/ANA na multiplicação *in vitro* de clones de *Eucalyptus grandis* × *E. urophylla* em biorreator de imersão temporária [Effects of culture medium and BA /NAA ratio on *in vitro* multiplication of *Eucalyptus grandis* × *E. urophylla* clones in temporary immersion bioreactor]. Revista Árvore 35(6):1207-1217.
- Oliveira ML de, Xavier A, Penchel RM, Santos AF (2011b). Multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus grandis* × *E. urophylla* cultivado em meio semissólido e em biorreator de imersão temporária [In vitro multiplication of *Eucalyptus grandis* × *E. urophylla* grown in semisolid medium and in temporary immersion bioreactor]. Scientia Forestalis 39(31):309-315.
- Peña-Ramírez YJ, Juárez-Gómez J, Gómez-López L, Jerónimo-Pérez JL, García-Sheseña I, González-Rodríguez JA, Robert ML (2010). Múltiple adventitious shoot formation in Spanish Red Cedar (*Cedrela odorata* L.) cultured *in vitro* using juvenile and mature tissues: an improved micropropagation protocol for a highly valuable tropical tree species. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant 46:149-160.
- Preil W (2005). General introduction: a personal reflection on the use of liquid media for *in vitro* culture. In: Preil W, Hvoslef-Eide AK (Eds). Liquid culture systems for *in vitro* plant propagation. Springer, Berlin pp 1-18.
- Quiala E, Barbón R, Jiménez E, Ferial M de, Chávez M, Capote A, Pérez N (2006). Biomass production of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf, a medicinal plant, in temporary immersion systems. In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant 42(3):298-300.
- Quiala E, Cañal MJ, Mejón M, Rodríguez R, Chávez M, Villedor L, ... Ferial M de, Barbón R (2012). Morphological and physiological responses of proliferating shoots of teak to temporary immersion and BA treatments. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 109:223-234.
- Schönherr J (2006). Characterization of aqueous pores in plant cuticles and permeation of ionic solutes. Journal of Experimental Botany 57(11):2471-2491.
- Shandil AS, Tuia VS (2015). Micropropagation of breadfruit (*A. altalis*) enhanced using a bioreactor system. Acta Horticulturae 1101:159-163.
- Tilkat E, Sützer V, Ersali A, Hoser A, Kilinc FM, Tilkat EA, ... Kaplan A (2014). Mass shoot proliferation of *Pistacia khinjuk* stocks using temporary immersion bioreactor system (TIS). Acta Horticulturae 1028:145-151.
- Troch V, Sapeta H, Werbroeck S, Geelen D, Van Labeke M-C (2010). *In vitro* culture of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) using temporary immersion bioreactors. Acta Horticulturae 885:383-389.
- Vidal N, Correa B, Rial E, Regueira M, Sánchez C, Cuenca B (2015a). Comparison of temporary and continuous immersion systems for micropropagation of axillary shoots of chestnut and willow. Acta Horticulturae 1083:227-233.
- Vidal N, Blanco B, Cuenca B (2015b). A temporary immersion system for micropropagation of axillary of hybrid chestnut. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 123:229-243.
- Vilchez J, Albany N (2015). Determinación de parámetros de cultivo en la germinación de embriones somáticos de *Psidium guajava* L. en sistemas de inmersión temporal de tipo RITA<sup>®</sup> [Determination of culture parameters in the germination of somatic embryos of *Psidium guajava* L. in temporary immersion systems RITA<sup>®</sup> type]. Revista de la Facultad de Agronomía LUZ 32:209-230.
- Welander M, Persson J, Asp H, Zhu LH (2014). Evaluation of a new vessel system based on temporary immersion system for micropropagation. Scientia Horticulturae 179:227-232.
- Whittemore R, Knaf K (2005). The integrative review: updated methodology. Journal of Advanced Nursing 52(5):546-553.
- Zhu L-H, Li X-Y, Welander M (2005). Optimization of growing conditions for the apple rootstock M26 grown in RITA containers using temporary immersion principle. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 81:313-318.

### CAPÍTULO 3 MICROPROPAGAÇÃO DE *Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus urophylla* EM DIFERENTES SISTEMAS DE IMERSÃO TEMPORÁRIA (TISs)

#### RESUMO

A micropropagação de plantas em Sistemas de Imersão Temporária (TISs), também conhecidos como Biorreatores de Imersão Temporária, é utilizada como alternativa à micropropagação em sistemas convencionais por meio da otimização do processo e redução dos custos, principalmente com agentes geleificantes e mão de obra especializada. Estes sistemas estão cada vez mais sendo usados nas biofábricas, as quais produzem plantas em larga escala e possuem elevado gasto de produção quando utilizam o processo convencional. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi comparar três diferentes TISs (ElecTIS, SETIS<sup>TM</sup> e Plantform<sup>TM</sup>) na propagação de plantas do híbrido *Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus urophylla*, e compará-los à propagação em meio convencional (semi-sólido). O meio de cultura utilizado para os TISs e o sistema semi-sólido foi o JADS acrescido de 0,3 mg/L de BAP e 0,1 mg/L de ANA, 30 g/L de sacarose e 4,9 g/L de ágar. A frequência de imersão programada para os três TISs foi a cada 8 h com 10 minutos de imersão. Foram avaliados a massa fresca nos tempos 0 e 21 dias e o número de brotos aos 21 dias de cultivo. O maior incremento em massa fresca foi apresentado pelo meio semi-sólido, o que foi associado ao maior tamanho de calo apresentado pelas plantas deste sistema. O maior número de brotos foi apresentado pelo ElecTIS. Nenhum dos sistemas apresentou plantas com características hiperhídricas. O biorreator ElecTIS foi considerado o sistema mais eficiente na propagação de plantas do híbrido *E. grandis* x *E. urophylla*.

**Palavras-chave:** Sistemas convencionais. ElecTIS. Frequência de imersão. Número de brotos.

#### ABSTRACT

Micropropagation of plants in Temporary Immersion Systems (TISs), also known as Temporary Immersion Bioreactors, is used as an alternative to micropropagation in conventional systems by means of process optimization and cost reduction, mainly with gelling agents and specialized labor. These systems are increasingly being used in biofactories, which produce large scale plants and have high production costs when using the conventional process. Thus, the objective of this work was to compare three different TISs (ElecTIS, SETIS<sup>TM</sup> and Plantform<sup>TM</sup>) in the propagation of *Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus urophylla* hybrid plants, and to compare them to propagation in conventional (semi-solid) media. The culture medium used for TIS and the semi-solid system was JADS plus 0.3 mg / L BAP and 0.1 mg / L ANA, 30 g / L sucrose and 4.9 g / L of agar. The scheduled immersion frequency for the three TISs was every 8 h with 10 minutes of immersion. The fresh mass was evaluated at day 0 and day 21 days and the number of shoots at 21 days of cultivation. The highest increment in fresh mass was presented by the semi-solid medium, which was associated with the largest callus size presented by the plants of this system. The highest number of shoots was presented by ElecTIS. None of the systems presented plants with hyperhydric characteristics. The Electis bioreactor was considered the most efficient system for the propagation of *E. grandis* x *E. urophylla* hybrid plants.

**Keywords:** Conventional systems. ElecTIS. Immersion frequency. Number of shoots.

## 1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de novas tecnologias na propagação de mudas em larga escala vem ganhando um espaço cada vez maior, principalmente para espécies de elevado interesse econômico, como é o caso do gênero *Eucalyptus* (OLIVEIRA et al., 2014). Um exemplo disso, são os Sistemas de Imersão Temporária (TISs), equipamentos com um certo nível de automação que utilizam meio líquido para a produção de plantas.

Estes sistemas são mais rentáveis que o método convencional, o qual utiliza meio semi-sólido, pois permitem maior ganho em biomassa e redução do tempo necessário para a propagação das plantas, consequência da maior aeração do meio de cultura e maior contato das brotações com este meio, as quais conseguem absorver mais nutrientes (DUTRA; WENDLING; BRONDANI, 2009). Além disso, por ser uma tecnologia com um certo nível de automação ocorre uma diminuição da mão de obra e consequentemente dos custos de produção, estabelecendo assim, um sistema prático de propagação de plantas *in vitro* (TAKAYAMA; AKITA, 2006; WELANDER et al., 2014).

Vários TISs vêm surgindo no mercado ao longo dos anos, buscando cada vez mais melhorar os aspectos ligados ao seu funcionamento, manuseio, maior produção de plantas em um espaço reduzido de tempo, além de prezarem por plantas de qualidade e um menor custo de produção. Dentre estes sistemas, podemos destacar três: SETIS<sup>TM4</sup>, *Plantform*<sup>TM5</sup> e *ElectIS*<sup>6</sup>. O último recentemente desenvolvido pela empresa italiana *explanta*, foi testado neste trabalho pela primeira vez e é um sistema inovador em relação aos demais biorreatores já existentes. Isto porque seu funcionamento ocorre por meio de um sistema pneumático, que permite que as trocas gasosas ocorram internamente ao frasco de cultura, evitando possíveis contaminações.

Apesar do elevado número de biorreatores existentes no mercado e dos diversos trabalhos que têm utilizado TIS na propagação de espécies eucalipto, como *E. grandis* X *E. urophylla* (BUSINGE et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2011a, 2011b e 2014; MÁXIMO et al., 2015), *E. globulus* (GONZÁLEZ et al., 2011) e *E. camaldulensis* (MENDONÇA et al., 2016), ainda são escassos estudos que comparam a eficácia de diferentes tipos de TISs na propagação de espécies arbóreas (CARVALHO et al., 2018), dentre elas árvores de eucalipto.

<sup>4</sup> Disponível em: <setis-systems.be>. Acesso em: 11 jan. de 2019

<sup>5</sup> Disponível em: < www.plantform.se>. Acesso em: 11 jan. 2019.

<sup>6</sup> Disponível em: < www.explanta.com/bioreactor-electis>. Acesso em: 11 jan. 2019.

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi comparar os biorreatores ElectIS, SETIS<sup>TM</sup> e *Plantform*<sup>TM</sup> na propagação do híbrido *E. grandis X E. urophylla* e compará-los com a propagação em meio semi-sólido.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Local de condução e material vegetal

Os experimentos foram conduzidos no “Laboratorio di Tecnologie In Vitro e di Crioconservazione” no IVALSA/CNR (Istituto per la Valorizzazione del Legno e delle Specie Arboree/Consiglio Nazionale delle Ricerche), Florença, Itália.

O material vegetal utilizado para introdução nos biorreatores foi originado de um híbrido comercial de *Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus urophylla* preestabelecidos *in vitro* por meio da micropropagação em meio semi-sólido JADS (CORREIA et al., 1995), acrescido de 0,3 mg/L de BAP e 0,1 mg/L de ANA, 30 g/L de sacarose e 4,9 g/L de ágar. O pH foi ajustado para 5,8 e os meios foram autoclavados a 121°C por 20 minutos.

O material vegetal foi mantido em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas a uma intensidade luminosa de 45  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  e temperatura de  $23\pm 1^\circ\text{C}$ .

### 2.2 Multiplicação em biorreator

Foram testados três sistemas de biorreatores de imersão temporária, ElecTIS, SETIS<sup>TM</sup> e *Plantform*<sup>TM</sup>, além do sistema de propagação convencional através do meio semi-sólido.

Como explantes iniciais para a cultura em biorreator e meio semi-sólido, foram utilizados brotos com aproximadamente 2 cm de comprimento com um pequeno calo na base e sem a presença da gema apical, pré-cultivados por 7 dias em meio semi-sólido JADS (idem ao tópico 2.1) antes da introdução nos biorreatores. Em cada biorreator foram introduzidos 50 brotos e em cada frasco, contendo 100 mL de meio semi-sólido, foram introduzidos 25 brotos.

O meio de cultura utilizado tanto para os biorreatores quanto para os frascos foi o mesmo citado no tópico 2.1 deste capítulo, com a diferença de conter 4,9 g/L de ágar no meio semi-sólido e o meio líquido utilizado nos biorreatores não conter ágar. Para os biorreatores ElecTIS e *Plantform*<sup>TM</sup> utilizou-se um volume de 500 mL de meio por recipiente e para o biorreator SETIS<sup>TM</sup>, 750 mL de meio de cultura foi utilizado. O meio e os biorreatores foram autoclavados separadamente, depois em fluxo laminar os explantes e o meio foram inseridos nos biorreatores.

Após a introdução do material vegetal em biorreatores, estes foram mantidos em sala de crescimento nas mesmas condições citadas no tópico 2.1. e foram programados para

funcionarem em uma frequência de imersão a cada oito horas por um período de imersão de dez minutos, baseados em testes anteriores em laboratório.

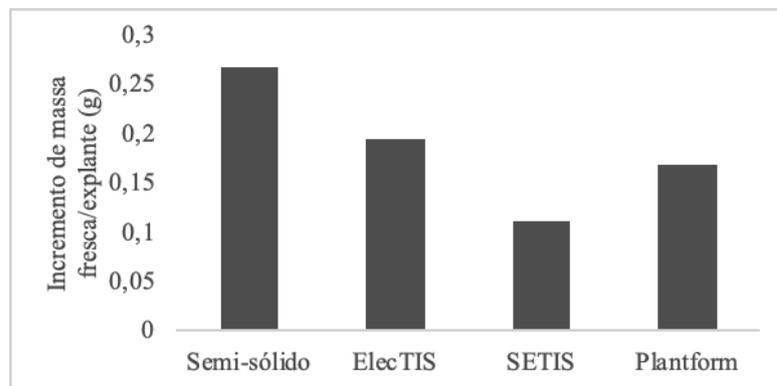
O experimento foi repetido duas vezes e ao final foi calculada a média aritmética dos resultados obtidos.

Para avaliação da massa fresca foi realizada a pesagem dos explantes aos 0 e 21 dias de idade da cultura. O número de brotos por explante foi obtido pela contagem de novos brotos desenvolvidos durante o ciclo de cultivo aos 21 dias de idade da cultura.

### 3 RESULTADOS

Após os 21 dias de cultivo dos explantes em biorreator e meio semi-sólido, o incremento de massa fresca foi analisado. As brotações originadas do método de cultivo tradicional, através do meio semi-sólido apresentaram o maior incremento de massa fresca (0,27g), quando comparadas às brotações propagadas nos biorreatores ElecTIS, que apresentaram um incremento de 0,19 g, *Plantform*<sup>TM</sup>, com 0,17 g e por último SETIS<sup>TM</sup>, com 0,11 g (FIGURA 1). Este resultado pode ser explicado pelo maior comprimento apresentado pelas brotações cultivadas em meio semi-sólido e também por estas brotações terem apresentado uma calosidade na base do explante, que se encontrava em contato direto com o meio de cultura (FIGURA 3 A).

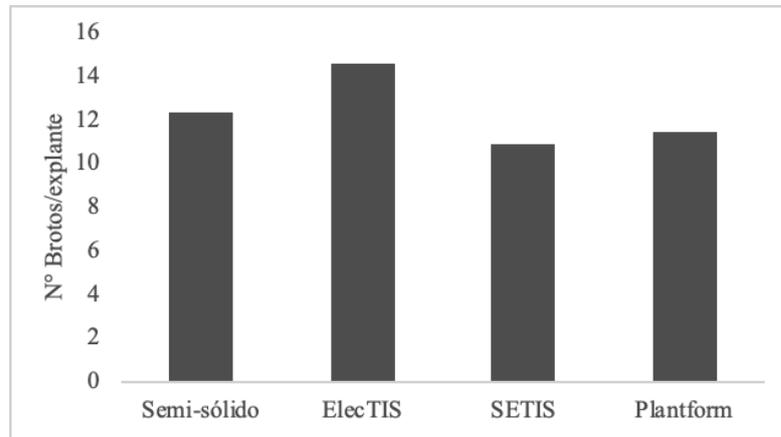
Figura 1 – Incremento de massa fresca de explantes cultivados em meio semi-sólido e nos biorreatores ElecTIS, SETIS<sup>TM</sup> e *Plantform*<sup>TM</sup>, na frequência de imersão a cada 8 h com imersão de 10 min, aos 21 dias de cultura do híbrido *E. grandis* X *E. urophylla*.



Fonte: Preparada pela autora.

Em relação à média do número de brotos por explante, foi observado que o biorreator ElecTIS apresentou o melhor resultado, com 14,6 brotos. Seguido pelo meio semi-sólido, com 12,4 brotos, depois o *Plantform*<sup>TM</sup> com 11,5 e por último o biorreator SETIS<sup>TM</sup> com 10,9 brotos por explante (FIGURA 2). Sugere-se que neste biorreator a fina lâmina de meio de cultura que ficou em contato com os explantes no intervalo entre as imersões tenha favorecido a maior produção de brotos.

Figura 2 – Número de brotos cultivados em meio semi-sólido e nos biorreatores ElecTIS, SETIS e Plantform, na frequência de imersão a cada 8 h com imersão de 10 min, aos 21 dias de cultura do híbrido *E. grandis X E. urophylla*.



Fonte: Preparada pela autora.

Além do biorreator ElecTIS ter apresentado o maior número de brotos por explante, as brotações produzidas neste biorreator eram mais homogêneas, apresentando um aglomerado de brotos de tamanhos similares, comparadas às brotações produzidas nos outros sistemas de cultivo. Em nenhum dos quatro sistemas de cultivo testados houve a propagação de plantas com características de hiperhidricidade (FIGURA 3).

Figura 3 – Brotações de *E. grandis X E. urophylla* aos 21 dias cultivadas em A - meio semi-sólido; B – ElecTIS; C - SETIS<sup>TM</sup> e D - Plantform<sup>TM</sup>, na frequência de imersão a cada 8 h com imersão de 10 min.



## 4 DISCUSSÃO

Os biorreatores vêm ganhando cada vez mais espaço na micropropagação de diversas espécies vegetais como uma alternativa que visa eliminar e, ou automatizar algumas etapas do processo de produção de plantas. Porém ainda assim, são escassos trabalhos que compararam diferentes tipos de TISs (CARVALHO et al., 2018) a fim de determinar qual sistema se adequa melhor a cada espécie.

Neste trabalho as plantas micropropagadas em meio semi-sólido apresentaram maior incremento de massa fresca em relação as plantas micropropagadas em TISs, o que pode ser entendido pelo maior comprimento de brotos e maior calosidade na base dos explantes apresentados pelas plantas cultivadas em meio semi-sólido, quando comparadas com as plantas cultivadas em biorreatores (FIGURA 3). Esse resultado corrobora com Businge et al. (2017), que também observaram menor presença de calos em plantas de *E. grandis* x *E. urophylla* produzidas em biorreatores, quando comparadas com as plantas de meio semi-sólido; e com o trabalho de McAlister et al. (2005), que ao compararem plantas de clones de eucalipto micropropagadas em RITA<sup>®</sup> e em meio semi-sólido, observaram maior calosidade na base dos caules provenientes do sistema semi-sólido.

Segundo McAlister et al. (2005), os calos formados nos explantes do meio semi-sólido foram prejudiciais no estágio de aclimatização das plantas, já que as raízes se formaram a partir dos calos e não diretamente do caule das plantas. Além disso, as concentrações de oxigênio nos vasos de cultura afetam o desenvolvimento das raízes, desde que a baixa disponibilidade de O<sub>2</sub> leva a redução do enraizamento ou à formação de raízes anormais (JACKSON, 2002 *apud* MCALISTER et al. 2005), e em sistemas semi-sólidos a mais baixa concentração de O<sub>2</sub> disponível no gel pode resultar em baixo desenvolvimento radicular.

O biorreator ElecTIS apresentou o melhor resultado em relação a taxa de multiplicação de brotos quando comparado com os demais sistemas testados neste trabalho. Ao se comparar TIS com o sistema semi-sólido, que foi o segundo com maior taxa de multiplicação de brotos, esta diferença pode ser compreendida pelo fato de que em meio líquido as plantas são banhadas pelo meio nutritivo, fazendo com que a absorção de nutrientes ocorra por toda a superfície do tecido levando conseqüentemente a formação de mais brotos, enquanto no meio semi-sólido esta absorção só ocorre na base do explante (GONZÁLEZ et al., 2011).

Além do ElecTIS ter proporcionado um maior número de brotos, os custos deste tipo de sistemas, que utilizam meio líquido na propagação de plantas, são menores comparados

aos sistemas semi-sólidos. Custos com o meio de cultura e seu preparo são reduzidos substancialmente em TISs pela eliminação do agente geleificante e do tempo de dispensa do meio de cultura, visto que no sistema semi-sólido cada alíquota de aproximadamente 25 mL deve ser dispensada frasco por frasco. Ocorre também uma redução no uso da autoclave, já que um menor número frascos e de meio de cultura são utilizados em cada transferência. O tempo de transferência das plantas para o TISs também são bem mais curtos, já que as plantas podem ser inseridas no vaso de uma única vez ou em poucas vezes, enquanto no sistema semi-sólido as plantas devem ser colocadas uma a uma cuidadosamente em uma profundidade adequada. Se novos nutrientes são necessários durante o ciclo de cultivo, no sistema convencional, um maior tempo e mais mão de obra é exigido, visto que os explantes devem ser trocados um a um para um novo meio de cultura, enquanto no TIS o meio antigo pode simplesmente ser retirado do recipiente e um novo meio ser adicionado. Usando os TISs, poucos frascos são utilizados, o que reduz os custos com lavagem (MC ALISTER et al., 2005).

Outros trabalhos com espécies de eucalipto também mostraram maior eficiência em TISs do que em sistemas semi-sólidos. Em *E. grandis* X *E. urophylla*, foi observado uma taxa de multiplicação de brotos de 5,75 vezes maior das plantas multiplicadas em biorreator do que aquelas multiplicadas em meio semi-sólido (BUSINGE et al., 2017). Hajari et al. (2006), trabalhando com clones de *E. grandis* X *E. urophylla* e clones de *E. grandis* observaram taxas de multiplicação de brotos variando de 0,5 a 1,58 vezes em plantas cultivadas em biorreator RITA<sup>®</sup> em comparação ao meio semi-sólido. Em um outro trabalho com o híbrido *E. grandis* X *E. urophylla* foi observado que o aumento do tempo de cultivo de 28 dias para 42 dias aumentou o número de brotos por explante cultivados em meio semi-sólido de ~5 a ~20 brotos, enquanto em biorreator RITA esse aumento foi maior, sendo de ~10 a ~30 brotos.

Já quando se faz uma comparação entre os três TISs, foi observado um melhor desempenho do ElecTIS em relação aos outros dois biorreatores (*Plantform*<sup>TM</sup> e *SETIS*<sup>TM</sup>). O menor incremento em massa fresca e menor número de brotos foram apresentados pelo biorreator *SETIS*<sup>TM</sup>.

O biorreator *SETIS*<sup>TM</sup> apresenta o princípio dos frascos gêmeos, composto por dois recipientes, no qual em um é colocado o meio de cultura e o outro os explantes. Tendo em vista o maior volume de meio de cultura que foi utilizado por este biorreator quando comparado aos biorreatores *Plantform*<sup>TM</sup> e ElecTIS, sugere-se que o mais baixo incremento em massa fresca e número de brotos por explantes possa ter ocorrido como resultado do maior volume de meio disponível por explante, já que foi usado 750 mL de meio para 50 explantes

(15 mL por explante), enquanto nos outros dois TISs o volume de meio por explante era de 10 mL.

Vilchez e Albany (2015) observaram que uma densidade de 500 mg de massa fresca de embriões somáticos inoculados no biorreator RITA<sup>®</sup>, resultou em um maior número de embriões com desenvolvimento normal quando comparados com 250 mg de inóculo para um mesmo volume de meio de cultura. A densidade de inóculo está diretamente ligada com a quantidade de volume de meio disponível por explante e também com o espaço físico para o seu desenvolvimento. Em café foi observado que uma baixa quantidade de inóculo, em que um maior volume de meio de cultura está disponível por explante, promove uma germinação estressante dos embriões e dependendo da magnitude do estresse, podem ocorrer danos permanentes no crescimento e desenvolvimento dos embriões, podendo levá-los a morte (BARBÓN et al., 2014). Em uma cultivar de cana-de-açúcar cultivada em TIS foi observado que maiores volumes de meio produziram menores taxas de multiplicação de brotos. E a explicação encontrada pelos autores foi de que substâncias químicas, que são secretadas no meio e estimulam o desenvolvimento de brotos, são diluídas quando grandes volumes de meio são utilizados (LORENZO et al., 1998).

Quando se compara os sistemas ElecTIS e *Plantform*<sup>TM</sup>, a diferença principal, como já citada anteriormente, é a respeito do princípio de funcionamento deles. Enquanto no *Plantform*<sup>TM</sup> o meio de cultura é impulsionado, pelo ar externo, até os explantes, no ElecTIS os explantes é que vão até o meio de cultura por meio de um sistema pneumático. Segundo os criadores do sistema ElecTIS, o diferencial dele está na eliminação do risco de contaminação, decorrente de conexões com o meio externo ([www.explanta.com/bioreactor-electis](http://www.explanta.com/bioreactor-electis)). Porém neste estudo, uma hipótese que pode explicar o maior número de brotos observados em ElecTIS em relação ao *Plantform*<sup>TM</sup> pode estar relacionada à pequena quantidade de meio de cultura que permanecia em contato com as plantas do biorreator ElecTIS, no período em que estas não estavam programadas para estarem em contato com o meio de cultura. Esta pequena quantidade de meio que permanecia em contato com os explantes no ElecTIS pode estar relacionada com as poucas e pequenas aberturas no fundo da cesta deste biorreator, as quais servem para a drenagem do meio de cultura. Visto que enquanto este biorreator apresenta apenas 6 aberturas de aproximadamente 0,5 cm nas extremidades do fundo da sua cesta, o biorreator *Plantform*<sup>TM</sup> apresenta três faixas com pequenas aberturas, que se estendem por todo o fundo da cesta deste biorreator, o que leva à uma drenagem mais eficaz do meio de cultura para o fundo do frasco. Este filme fino de meio de cultura que permanecia em contato com as plantas do sistema ElecTIS no momento que a cesta estava suspensa (período de 8 h –

intervalo entre as imersões), pode ter contribuído para absorção ainda maior de meio de cultura pelas plantas, levando ao maior número de brotos alcançados ao final do período de cultivo.

Não existe na literatura trabalhos com eucalipto utilizando o biorreator ElectIS e nem trabalhos que comparem este biorreator com outros tipos de TISs. Sendo um sistema desenvolvido recentemente, o pouco que foi encontrado a respeito do seu desempenho foi apresentado pelo pesquisador Maurizio Lambardi no *III Convegno Nazionale sulla Micropropagazione (VitroSOI 2017)*. Plantas do gênero *Paulownia* ao serem cultivadas em ElectIS apresentaram uma Taxa de Crescimento Relativo (TCR) de 13,6 comparada à 9,8 quando cultivadas em sistema convencional, *Chrysanthemum* apresentou uma TCR de 10,0 em plantas propagadas em ElectIS e 6,12 para as propagadas em meio semi-sólido. E por fim, *Nandina domestica* apresentou uma TCR de 8,84 em ElectIS e 7,15 em meio semi-sólido (LAMBARDI, 2017).

Muitos trabalhos com micropropagação de eucalipto em TISs apresentaram plantas com características hiperhídricas (GONZÁLEZ et al., 2011; HAJARI et al., 2006; MENDONÇA et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2011a; OLIVEIRA et al., 2011b; OLIVEIRA et al., 2014). A hiperhidricidade é um fenômeno em que os brotos se tornam vítreos e transparentes, com folhas e caules inchados e quebradiços (LE ROUX; VAN STADEN, 1991). Este problema é muito relatado em plantas que utilizam o meio de cultura líquida, e pode ser contornado com o uso de procedimentos como: injeção de ar no sistema, ajuste da frequência e tempo de imersão e redução na concentração de citocinina (CARVALHO et al., 2018).

No presente estudo nenhum dos TISs e nem o sistema semi-sólido apresentaram plantas hiperhídricas, o que demonstra que a frequência e tempo de imersão, as trocas gasosas e a concentração de citocinina no sistema foram adequadas para o híbrido *E. grandis X E. urophylla* utilizado neste experimento.

## 5 CONCLUSÃO

O biorreator ElecTIS é considerado um sistema eficiente na propagação de plantas do híbrido *E. grandis x E. urophylla*, pois apresenta o mais alto valor de multiplicação de brotos quando comparados ao sistema convencional e os outros TISs. Além disso, ele apresenta ausência de calosidades e ausência de hiperhidricidade e é um sistema com baixo custo de produção e baixo custo de mão de obra.

## REFERÊNCIAS

- BARBON, R. et al. Efecto de la densidad de inoculación en la germinación de embriones somáticos de *Coffea arabica* L. cv. ‘Caturra rojo’ en Sistemas de Inmersión Temporal RITA®. **Biotecnología Vegetal**, Santa Clara, v. 14, n. 2, p. 91-97, 2014.
- BUSINGE, E. et al. Evaluation of a new temporary immersion bioreactor system for micropropagation of cultivars of eucalyptus, birch and fir. **Forests**, Basileia, v. 8, n. 196, p. 1-9, 2017.
- CARVALHO, L. S. O. et al. Temporary Immersion System for Micropropagation of Tree Species: a Bibliographic and Systematic Review. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, Cluj-Napoca, v. 47, n. 2, p. 269-277, 2018.
- CORREIA, D. et al. Efeito do meio de cultura líquido e sólido no crescimento e desenvolvimento de gemas de *Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus urophylla* na multiplicação in vitro. **IPEF**, Piracicaba, n. 48/49, p. 107-116, 1995.
- DUTRA, L. F.; WENDLING, I.; BRODANI, G. E. A micropropagação de eucalipto. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Cascável, n. 58, p. 49-59, 2009.
- HAJARI, E. et al. Plant regeneration from induced callus of improved Eucalyptus clones. **South African Journal of Botany**, Amsterdam, v. 72, p. 195-201, 2006.
- GONZÁLEZ, R. et al. Multiplicación in vitro de *Eucalyptus globulus* mediante sistema de inmersión temporal. **Bosque**, Valdivia, v. 32, n. 2, p. 147-154, 2011.
- LAMBARDI, M. Una nuova proposta per la coltura liquida in immersione temporanea: il bioreattore ‘ElecTIS’. In: III CONVEGNO NAZIONALE SULLA MICROPROPAGAZIONE, 3., 2017, Pescia, **Anais eletrônicos...Pescia: VitroSOI**, 2017. Disponível em: <<http://www.vitrosoi2017.it/docs/Presentazioni/Sessione3/Lambardi.pdf>>. Acesso em: 18 nov. 2018.
- LE ROUX, J. J.; VAN STADEN, J. Micropropagation and tissue culture of *Eucalyptus* - A review. **Tree Physiology**, Oxford, v. 9, p. 435-77, 1991.
- LORENZO, J. C. et al. Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Nova Iorque, v. 54, p. 197-200, 1998.
- MÁXIMO, W. P. F. et al. Nitrate (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) and ammonium (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) ratios for propagation of *Eucalyptus* hybrid in two different *in vitro* cultivation systems. **Australian Journal of Crop Science**, Brisbane, v. 9, n. 12, p. 1242-1248, 2015.
- MCALISTER, B. et al. Use of temporary immersion bioreactor system (RITA®) for production of commercial *Eucalyptus* clones in Mondi Forest (SA). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Nova Iorque, v. 81, n. 3, p. 347-358, 2005.

MENDONÇA, E. G. et al. The use of continuous, temporary immersion bioreactor system and semisolid culture medium for the production of *Eucalyptus camaldulensis* clones. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 26, n. 4, p. 1211-1224, 2016.

OLIVEIRA, M. L. de. et al. Efeito do intervalo de imersão e de injeção de ar na multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* em biorreator de imersão temporária. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 24, n. 1, p. 37-45, 2014.

OLIVEIRA, M. L. de. et al. Efeitos do meio de cultura e da relação BAP/ANA na multiplicação *in vitro* de clones de *Eucalyptus grandis* X *E. urophylla* em biorreator de imersão temporária. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 35, n. 6, p. 1207-1217, 2011a.

OLIVEIRA, M. L. de. Multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* cultivado em meio semissólido e em biorreator de imersão temporária. **Scientia Forestalis**, Paragominas, v. 39, n. 31, p. 309-315, 2011b.

TAKAYAMA, S.; AKITA, M. Bioengineering aspects of bioreactor application in plant propagation. In: GUPTA, S. D.; IBARAKI, Y. **Plant tissue culture engineering**. Dordrecht: Springer, 2005. p.83-100.

VILCHEZ, J.; ALBANY, N. Determinacion de parametros de cultivo en la germinacion de embriones somaticos de *Psidium guajava* L. en sistemas de inmersion temporal de tipo RITA<sup>®</sup>. **Revista de la Facultad de Agronomia LUZ**, Maracaibo, v. 32, p. 209-230, 2015.

WELANDER, M.; et al. Evaluation of a new vessel system based on temporary immersion system for micropropagation. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 179, p. 227-232, 2014.

## CAPÍTULO 4 CRIOPRESERVAÇÃO DE ÁPICES CAULINARES DE EUCALIPTO PELOS MÉTODOS DE *DROPLET-VITRIFICATION* E CRIOPLACA

### RESUMO

A criopreservação é uma ferramenta essencial para manutenção de germoplasma a longo prazo, com mínimo requerimento de custo e trabalho, e baixo risco de perda das amostras criopreservadas. O uso da criopreservação de material genético em larga escala é ainda muitas vezes prejudicado pela indisponibilidade de metodologias adequadas e respostas genótipo específica de diversas espécies aos tratamentos crioprotetivos. Novas metodologias de criopreservação como a *droplet-vitrification* e criolaca foram desenvolvidas com o intuito de cada vez mais facilitar e serem mais eficientes que os métodos clássicos de criopreservação. O objetivo deste estudo foi otimizar o meio de pré-cultivo, o crioprotetor e o tempo de exposição à ele, comparar os métodos *droplet-vitrification* e crioplaca para o híbrido *Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus urophylla* e comparar fontes de explantes com idade de 20 dias e 3 anos na criopreservação de *Eucalyptus grandis*. O melhor meio de pré-cultivo foi o de 0,125; 0,25 e 0,5 M, o melhor crioprotetor foi o PVS2 com exposição dos explantes aos 15 e 30 minutos e a *droplet-vitrification* apresentou os melhores resultados. A porcentagem de sobrevivência de *E. grandis* X *E. urophylla* aos 15 e 30 minutos após a criopreservação foi de 30% para ambos os tempos e a porcentagem de regeneração foi de 10%, também para ambos os tempos de exposição ao PVS2. Em *E. grandis* foi observada uma porcentagem de sobrevivência de 48% dos explantes provenientes de plantas com 20 dias e ausência de sobrevivência dos explantes oriundos de plantas com 3 anos. Para o híbrido *E. grandis* X *E. urophylla* a criopreservação utilizando os parâmetros otimizados não apresentou uma porcentagem de sobrevivência considerada como ideal para o estabelecimento de bancos criogênicos e para *E. grandis* foi observado que a idade possui grande influência no resultado final da criopreservação.

**Palavras-chave:** *Eucalyptus grandis* X *E. urophylla*. *Eucalyptus grandis*. Pré-cultivo. Crioprotetor. Método criogênico.

## ABSTRACT

Cryopreservation is an essential tool for the maintenance of germplasm in the long term, with minimum requirement of cost and labor, and low risk of loss of cryopreserved samples. The use of cryopreserved genetic material on a large scale is still often hampered by the unavailability of appropriate methodologies and specific genotype responses for several species to cryoprotectant treatments. New cryopreservation methodologies such as droplet-vitrification and cryoplate have been developed with the aim of increasingly facilitating the process and being more efficient than classical methods of cryopreservation. The objective of this study was to optimize the preculture medium, the cryoprotectant and the time of exposure to it, to compare the droplet-vitrification and cryoplate methods for the hybrid *Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus urophylla* and to compare sources of explants with age of 20 days and 3 years in the cryopreservation of *Eucalyptus grandis*. The best pre-culture medium was 0.125; 0.25 and 0.5 M, the best cryoprotectant was PVS2 with exposure of the explants at 15 and 30 minutes and droplet-vitrification showed the best results. The survival percentage of *E. grandis* X *E. urophylla* at 15 and 30 minutes after cryopreservation was 30% for both times and the regeneration percentage was 10%, also for both PVS2 exposure times. In *E. grandis*, a survival percentage of 48% of explants from 20 day old plants and absence of survival of 3 year old explants was observed. For the *E. grandis* X *E. urophylla* hybrid the cryopreservation using the optimized parameters did not present a percentage of survival considered ideal for the establishment of cryogenic banks and for *E. grandis* it was observed that age has a great influence on the final result of cryopreservation.

**Keywords:** *Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus urophylla*. *Eucalyptus grandis*. Pre-culture. Cryoprotectant. Cryogenic method.

## 1 INTRODUÇÃO

As espécies de eucalipto possuem grande interesse comercial devido suas inúmeras aplicações industriais (MÁXIMO et al., 2015). E cada vez mais programas de melhoramento associados à transformação genética estão desenvolvendo genótipos com maior produtividade, qualidade e sustentabilidade. No entanto, são necessários métodos para manutenção das plantas geneticamente modificadas enquanto testes em casa de vegetação e campo ocorrem antes da liberação das plantas para produção comercial (PADAYACHEE et al., 2009).

Embora métodos de manutenção em estufa e em campo sejam essenciais em tais programas, eles são de elevado risco, devido as plantas estarem suscetíveis à estresses bióticos (fungos, bactérias e ataques de patógenos) e abióticos (seca, inundações, dentre outros) na conservação *ex situ*. Além de serem métodos caros em termos de mão de obra, uso da terra e da água (WATT et al., 1997, 2000).

Desta forma, tecnologias de conservação *in vitro*, como a criopreservação, podem minimizar tais danos e serem incluídas como estratégias para manutenção destes genótipos (ENGELMANN, 1997; RAO, 2004; WATT et al., 1997; 2000).

A criopreservação é um método de armazenamento de material vegetal a temperaturas ultra-baixas, como a do nitrogênio líquido (-196°C), no qual nesta temperatura todas atividades metabólicas cessam e nenhuma alteração genética ocorre no material (ENGELMANN, 2004). Este método é uma estratégia muito útil na complementação de outros métodos de manutenção já existentes, servindo como uma forma de *backup* de uma ampla base genética para propostas de melhoramento, manutenção de clones elite durante ensaios de campo e para manutenção de espécies ameaçadas de extinção, devido principalmente à atividade humana e ao aquecimento global (CARNEROS et al., 2017; LI et al., 2018; PADAYACHEE et al., 2009).

A criopreservação é o único meio seguro e econômico de conservação de genótipos à longo prazo (DIXIT et al., 2004). Além disso, este método requer a ocupação de um espaço mínimo para armazenamento do material a ser criopreservado, custo reduzido já que não são necessários subcultivos das plantas, baixa incidência de contaminação e baixo risco de variação somaclonal (AHN; CHOI, 2017; ENGELMANN, 1992; NAIRN, 1993; PUKACKI; JUSZCZYK, 2015).

O ponto crucial para se obter sucesso na criopreservação está na remoção de água celular antes do congelamento, para evitar a ocorrência de cristais de gelo, os quais podem

levar à morte celular (DUMET et al., 1994; PADAYACHEE et al., 2009). A remoção da água no interior das células é realizada de acordo com o método criogênico utilizado. No caso dos métodos *droplet-vitrification* e crioplaca, ambos são baseados na vitrificação, em que a desidratação ocorre por meio da exposição dos explantes à soluções crioprotetoras altamente concentradas (ENGELMANN, 2004; REED et al., 2006).

O método da crioplaca foi desenvolvido recentemente com o intuito de aprimorar a *droplet-vitrification*. E mesmo ainda sendo pouco utilizado, este novo método oferece vantagens como: maior facilidade de manuseamento, por fazer uso de crioplacas de alumínio, e utilização de alginato de sódio para o encapsulamento dos ápices, o qual pode minimizar o efeito tóxico dos crioprotetores (NIINO et al., 2013; YAMAMOTO et al., 2011b).

Em eucalipto, a técnica de *droplet-vitrification* apresentou rápidas taxas de congelamento e aquecimento por utilizar folhas de alumínio no processo da cr apresentou grande sucesso quando comparada com a técnica *encapsulation-dehydration*, a qual não utiliza soluções de vitrificação para a desidratação e sim desidratação por meio de fluxo de ar ou sílica gel (KAYA et al., 2013).

Já em relação à crioplaca, não foram encontrados trabalhos com eucalipto.

O passo de pré-cultivo em meios com alta concentração de sacarose também auxilia na desidratação osmótica dos explantes, retirando água das células e impedindo a formação de cristais de gelo (ZHU et al., 2006). E em eucalipto este é um passo crucial, devido à alta sensibilidade à dessecação que este gênero representa (PADAYACHEE et al., 2009).

Vários fatores interferem na recuperação das plantas após a criopreservação. Entre eles pode ser citado a idade da planta mãe que irá fornecer o explante a ser criopreservado (UCHENDU; REED, 2008), a composição do crioprotetor e o tempo de exposição à ele, entre outros. O material deve ser o mais jovem possível, pois de acordo com Kulus e Zalewska (2014), as células deste tipo de material são mais tolerantes ao congelamento. A composição dos crioprotetores também deve ser levada em consideração, visto que muitos deles possuem componentes altamente tóxicos às plantas (VUJOVIĆ et al., 2011), e o tempo de exposição ao crioprotetor pode variar com o tipo de explante e espécie utilizada.

Diante do exposto acima, o objetivo deste trabalho foi otimizar o meio de pré-cultivo, o crioprotetor e o tempo de exposição à ele, além de comparar os métodos *droplet-vitrification* e crioplaca para o híbrido *E. grandis X E. urophylla* e comparar fontes de explantes com idades diferentes na criopreservação de *E. grandis*.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Experimento 1

No presente experimento foram testados três meios de pré-cultivo com sacarose, três tipos de crioprotetores e dois métodos criogênicos.

#### 2.1.1 Local de condução e material vegetal

Os experimentos foram conduzidos no “Laboratorio di Technologie In Vitro e di Crioconservazione” no IVALSÀ/CNR (Istituto per la Valorizzazione del Legno e delle Specie Arboree/Consiglio Nazionale delle Ricerche), localizado em Florença na Itália e no Laboratório Central de Biologia Molecular (LCBM), na Universidade Federal de Lavras (UFLA).

Foram utilizados ápices caulinares do híbrido comercial de *Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus urophylla*, provenientes de plantas preestabelecidas *in vitro* por meio da micropropagação em meio semissólido. As plantas foram cultivadas em meio de cultura JADS (CORREIA et al., 1995), acrescido de 0,3 mg/L de BAP (6-benzilaminopurina) e 0,1 mg/L de ANA (ácido naftalenoacético), 30 g/L de sacarose e 4,9 g/L de ágar. O pH foi ajustado para 5,8 e os meios foram autoclavados a 121°C por 20 minutos.

#### 2.1.2 Otimização dos meios de pré-cultivo (curvas de sacarose)

Foram testadas três curvas de sacarose para o pré-cultivo dos ápices caulinares. Para confecção das curvas de sacarose, ápices caulinares foram excisados e colocados em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), passando pelos seguintes gradientes de sacarose: 0,125; 0,25; 0,5 e 1 M (curva 1), 0,125; 0,25 e 0,5 M (curva 2), com os ápices permanecendo 24 h em cada concentração e 0,5 M (curva 3), com os ápices permanecendo por 48 h seguidas nesta concentração. Os ápices foram mantidos no escuro, durante o pré-cultivo e depois foram transferidos para meio de cultura JADS (idem tópico 2.1.1, adicionado de 0,1 g/L de ácido ascórbico) e armazenado em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas a uma intensidade luminosa de 45  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  e temperatura de 23 $\pm$ 1°C, onde permaneceram por 30 dias até a avaliação.

### 2.1.3 Otimização de crioprotetores (curva de crioprotetores) e dos métodos criogênicos

Neste experimento foram testados três crioprotetores: PVS2 (30% glicerol (p/v), 15% de etilenoglicol (p/v), 15% de dimetilsulfóxido (p/v), e 0,4 M de sacarose [13,7% (p/v)] em meio MS) (SAKAI; KOBAYASHI; OIYAMA, 1990), PVS3 (50% de glicerol (p/v) e 50 % de sacarose em meio MS) (NISHIZAWA et al. 1993) e VSL (20% (p/v) glicerol, 30% (p/v) etilenoglicol, 5% (p/v) sacarose, 10% (p/v) dimetilsulfóxido e 10 mM CaCl<sub>2</sub>) (SUZUKI et al., 2008) e dois métodos criogênicos: *droplet-vitrification* e crioplaca.

Para o método da *droplet-vitrification* foram utilizadas tiras de papel alumínio autoclavados (5 X 15 mm), sobre as quais foram colocadas 3 gotas do crioprotetor utilizado e sobre cada gota foi colocado um ápice, o qual permaneceu em contato com o crioprotetor durante 15, 30, 45, 60, 75 e 90 minutos, sendo que no processo com o PVS2 e VSL os ápices foram mantidos à temperatura de 0°C e o com PVS3 eles foram mantidos à temperatura ambiente.

Para o método da crioplaca, foram utilizadas crioplasmas de alumínio contendo 10 poços. Em cada poço foi adicionado 5 µL de uma solução de alginato a 3%, com 30 g/L de sacarose diluídos em meio MS livre de cálcio. Em seguida, foi adicionado um ápice em cada poço contendo alginato e estes foram cobertos por uma solução de cloreto de cálcio à 100 mM. Após 30 minutos, a solução de cloreto foi retirada e os ápices encontravam-se encapsulados aderidos à crioplaca. As crioplasmas contendo os ápices foram imersas nos crioprotetores utilizados, onde permaneceram durante 15, 30, 45, 60, 75 e 90 minutos, sendo que no processo com o PVS2 e VSL os ápices foram mantidos à temperatura de 0°C e o com PVS3 eles foram mantidos à temperatura ambiente.

Em seguida, os ápices de ambos os métodos criogênicos foram imersos em *washing solution* (meio MS contendo 1,2 M de sacarose), onde permaneceram em temperatura ambiente por 15 minutos. Decorrido este tempo os ápices foram transferidos para meio de cultura JADS (idem tópico 2.1.1, adicionado de 0,1 g/L de ácido ascórbico) e mantidos no escuro por 5 dias e depois transferidos para câmara de crescimento com fotoperíodo de 16 horas a uma intensidade luminosa de 45 µmol/m/s e temperatura de 23±1°C, onde permaneceram por 30 dias até a avaliação.

#### 2.1.4 Criopreservação

Depois da otimização do meio de pré-cultivo, tipo de crioprotetor e tempo de exposição, foram escolhidos para o experimento de criopreservação o pré-cultivo em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com 0,125; 0,25 e 0,5 M de sacarose, o crioprotetor PVS2 nos tempos 15, 30 e 60 minutos, sendo este último escolhido com base em experimentos anteriores realizados no LCBM. Apesar da *droplet-vitrification* ter apresentado os melhores resultados em relação à crioplaca, ambos os métodos foram utilizados, visto que experimentos anteriores realizados no LCBM o método crioplaca apresentou os melhores resultados.

Ápice caulinares (1 mm) foram excisados e transferidos para meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) semissólido, contendo 0,125 M de sacarose e mantidos por 24 h em temperatura de  $26\pm 2^{\circ}\text{C}$  e ausência de luz. Em seguida foram transferidos para o mesmo meio, porém com 0,25 M de sacarose e depois para 0,5 M de sacarose, onde também permaneceram por 24 h em cada concentração sempre mantidos nas mesmas condições de temperatura e luminosidade.

Para o método *droplet-vitrification* foram adicionadas 3 gotas (cada uma com 5  $\mu\text{L}$ ) de PVS2 em tiras de papel alumínio autoclavados (5 X 15 mm) e sobre cada gota foi colocado um ápice, onde permaneceram por 15, 30 e 60 minutos à  $0^{\circ}\text{C}$ .

Após cada tempo, as tiras de alumínio contendo os ápices foram colocadas em criotubos de 1,5 mL contendo nitrogênio líquido, fechados, identificados e mergulhados em nitrogênio. Após 1 h em nitrogênio líquido, os ápices juntamente com a tira de alumínio foram retirados dos criotubos e imersos em uma solução denominada *washing solution* (meio MS contendo 1,2 M de sacarose), permanecendo em temperatura ambiente durante 15 min. Em seguida, os ápices foram inoculados em meio de cultura JADS (idem tópico 2.1.1, adicionado de 0,1 g/L de ácido ascórbico) e mantidos no escuro por 5 dias na temperatura de  $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ , a fim de evitar a oxidação dos ápices. Após este período, os ápices foram transferidos para sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas a uma intensidade luminosa de  $45 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  e temperatura de  $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ , onde permaneceram por 30 dias até a avaliação. Os tratamentos imersos em nitrogênio líquido foram chamados de LN<sup>+</sup>.

Os ápices caulinares que não foram imersos em nitrogênio líquido (LN<sup>-</sup>), após serem expostos à solução de PVS2, foram diretamente transferidos para a *washing solution*, onde também permaneceram em temperatura ambiente por 15 minutos e logo após foram inoculados em meio JADS (idem tópico 2.1.1, adicionado de 0,1 g/L de ácido ascórbico).

Para o método da crioplaca foram utilizadas crioplacas de alumínio contendo 10 poços. Em cada poço foi adicionado 5  $\mu\text{L}$  de uma solução de alginato de sódio a 3%, com 30 g/L de sacarose diluídos em meio MS livre de cálcio. Em seguida, foi adicionado um ápice em cada poço contendo alginato e estes foram cobertos por uma solução de cloreto de cálcio à 100 mM. Após 30 minutos, a solução de cloreto foi retirada e os ápices encontravam-se encapsulados aderidos à crioplaca. As crioplacas contendo os ápices foram imersas no crioprotetor PVS2, onde permaneceram durante 15, 30 e 60 minutos à 0°C.

Após cada tempo, as crioplacas contendo os ápices foram colocadas em criotubos de 1,5 mL contendo nitrogênio líquido, fechados, identificados e mergulhados em nitrogênio líquido. Após 1 h em nitrogênio líquido, as crioplacas com os ápices foram retiradas dos criotubos e imersas na *washing solution*, em temperatura ambiente durante 15 min. Em seguida, os ápices foram inoculados em meio de cultura JADS (idem tópico 2.1.1, adicionado de 0,1 g/L de ácido ascórbico) e mantidos no escuro por 5 dias na temperatura de  $26\pm 2^\circ\text{C}$ . Após este período, os ápices foram transferidos para sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas a uma intensidade luminosa de  $45 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  e temperatura de  $26\pm 2^\circ\text{C}$ , onde permaneceram por 30 dias até a avaliação. Os tratamentos imersos em nitrogênio líquido foram chamados de  $\text{LN}^+$ .

Os ápices caulinares que não foram imersos em nitrogênio líquido ( $\text{LN}^-$ ), após serem expostos à solução de PVS2, foram diretamente transferidos para a *washing solution*, onde também permaneceram em temperatura ambiente por 15 minutos e logo após foram inoculados em meio JADS (idem tópico 2.1.1, adicionado de 0,1 g/L de ácido ascórbico).

Além do controle que não passou pelo nitrogênio líquido ( $\text{LN}^-$ ), mais dois controles foram realizados. Ápices caulinares excisados e diretamente inoculados em meio JADS foram chamados de Controle Total e ápices caulinares que passaram pelos meios de pré-cultivo com sacarose e logo em seguida foram inoculados em meio JADS foram chamados de Controle Sacarose.

### 2.1.5 Análises estatística

Foi utilizado o Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC), cada tratamento foi constituído por 3 repetições e cada repetição por 10 ápices caulinares, exceto para o experimento de otimização do pré-cultivo, em que cada repetição foi composta de 20 ápices. Após 30 dias em meio JADS, avaliou-se a porcentagem de sobrevivência, a porcentagem de regeneração dos ápices e a média do número de brotos por ápices caulinares. Os dados foram

submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de *Scott-Knott* a 95% de significância por meio do programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 1999).

## 2.2 Experimento 2

Neste experimento foram testadas duas fontes de explantes com idades diferentes: brotações com 20 dias e brotações com 3 anos (subcultivadas a cada 20 dias). Os ápices caulinares foram expostos ao crioprotetor PVS2 por 60 minutos e apenas o método crioplaca foi utilizado, parâmetros estes baseados em um pré-teste realizado no LCBM com ápices caulinares de *E. grandis*.

### 2.2.1 Local de condução e material vegetal

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório Central de biologia Molecular (LCBM), na Universidade Federal de Lavras (UFLA).

Foram utilizados ápices caulinares de *Eucalyptus grandis* originados de sementes. Brotações de *E. grandis* com 20 dias e brotações com 3 anos foram preestabelecidas *in vitro* por meio da micropropagação em meio semissólido. As plantas foram cultivadas em meio de cultura *Woody Plant Medium* (WPM) (LLOYD; MCCOWN, 1981), acrescido de 0,01 mg/L de BAP, 0,1 mg/L de ANA, 0,1 mg/L AIB (ácido indolbutírico), 20 g/L de glicose e 4 g/L de ágar por 20 dias antes da criopreservação. O pH foi ajustado para 5,8 e os meios foram autoclavados a 121°C por 20 minutos.

### 2.2.2 Criopreservação

Ápices caulinares (1 mm) foram excisados e transferidos para meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) semissólido, contendo 0,25 M de sacarose e mantidos por 24 h em temperatura de 26±2°C e ausência de luz. Em seguida foram transferidos para o mesmo meio, porém com 0,5 M de sacarose, onde também permaneceram por 24 h em cada concentração sempre mantidos nas mesmas condições de temperatura e luminosidade.

Para este experimento foram utilizadas crioplacas de alumínio contendo 10 poços. Em cada poço foi adicionado 3 µL de uma solução de alginato de sódio a 3%, com 30 g/L de sacarose diluídos em meio MS livre de cálcio. Em seguida, foi adicionado um ápice em cada

poço contendo alginato de sódio e estes foram cobertos por uma solução de cloreto de cálcio à 100 mM. Após 30 minutos, a solução de cloreto foi retirada e os ápices encontravam-se encapsulados aderidos à crioplaca. As crioplacas contendo os ápices foram imersas em *loading solution* (2M de glicerol e 0,4 M de sacarose em meio MS) por 15 minutos em temperatura ambiente. Logo após as crioplacas foram imersas no crioprotetor PVS2, onde permaneceram por 60 minutos à temperatura de 0°C.

Decorrido os 60 minutos as crioplacas foram colocadas em criotubos de 1,5 mL contendo nitrogênio líquido, fechados, identificados e mergulhados em nitrogênio líquido. Após 1 h em nitrogênio líquido, as crioplacas contendo os ápices foram retiradas dos criotubos e imersas na *washing solution* (meio MS contendo 1,2 M de sacarose), em temperatura ambiente durante 15 min. Em seguida, os ápices foram inoculados em meio de cultura WPM acrescido 0,5 mg/L de BAP, 0,02 mg/L de ANA, 20 g/L de sacarose, 4 g/L de ágar e 0,1 g/L de ácido ascórbico, e mantidos no escuro por 5 dias na temperatura de 26±2°C.

Após este período, os ápices foram transferidos para sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas a uma intensidade luminosa de 45  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ , temperatura de 26±2°C, porém sem incidência de luz direta sobre eles e permaneceram por dois dias nesta condição. Depois foram transferidos para um outro local da mesma sala de crescimento, desta vez com incidência de luz direta sobre eles e, onde permaneceram por 30 dias até a avaliação, com renovação do meio de cultura aos 15 dias. Os tratamentos imersos em nitrogênio líquido foram chamados de LN<sup>+</sup>.

Os ápices caulinares que não foram imersos em nitrogênio líquido (LN<sup>-</sup>), após serem expostos à solução de PVS2, foram diretamente transferidos para a *washing solution*, onde também permaneceram em temperatura ambiente por 15 minutos e logo após foram inoculados em meio WPM (idem ao citado neste tópico).

### 2.2.3 Análises estatísticas

Foi utilizado o Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC), cada tratamento foi constituído por 5 repetições e cada repetição por 10 ápices caulinares. Após 30 dias em meio de cultura WPM, avaliou-se a porcentagem de sobrevivência dos brotos. A porcentagem de regeneração dos ápices e a média do número de brotos por ápices caulinares não foi calculada neste experimento, visto que grande parte dos ápices ainda estavam muito pequenos para estas avaliações. Desta forma estes parâmetros serão calculados após 60 dias da criopreservação. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas

pelo teste de *Scott-Knott* a 95% de significância por meio do programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 1999).

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Experimento 1

##### 3.1.1 Otimização dos meios de pré-cultivo (curvas de sacarose)

Ao avaliar as três curvas de sacarose (FIGURA 4), observou-se que não houve diferença estatística entre elas em relação a porcentagem de sobrevivência (FIGURA 4 A) e porcentagem de regeneração (FIGURA 4 B) dos ápices caulinares, porém a média do número de brotos por ápice foi maior para a curva 2 (FIGURA 4 C e 5 B). Apesar de não ter sido observada diferença estatística na % de sobrevivência e % de regeneração dos ápices, visualmente a curva 2 (0,125; 0,25 e 0,5 M de sacarose) apresentou brotos maiores e mais desenvolvidos que as outras duas curvas (FIGURA 5). Estes resultados mostraram a curva 2 como melhor opção para o pré-cultivo dos ápices, para o híbrido estudado.

Figura 1 – Curvas sacarose de *E. grandis* x *E. urophylla*. A - Porcentagem de Sobrevivência, B - Porcentagem de Regeneração e C - Brotos/Ápices. Curva 1 – 0,125; 0,25; 0,5; 1 M, B: Curva 2 – 0,125; 0,25; 0,5 M e Curva 3 – 0,5 M. Médias seguidas pelas mesmas letras pertencem ao mesmo grupo pelo teste de *Scott-Knott* ( $p < 0,05$ ).

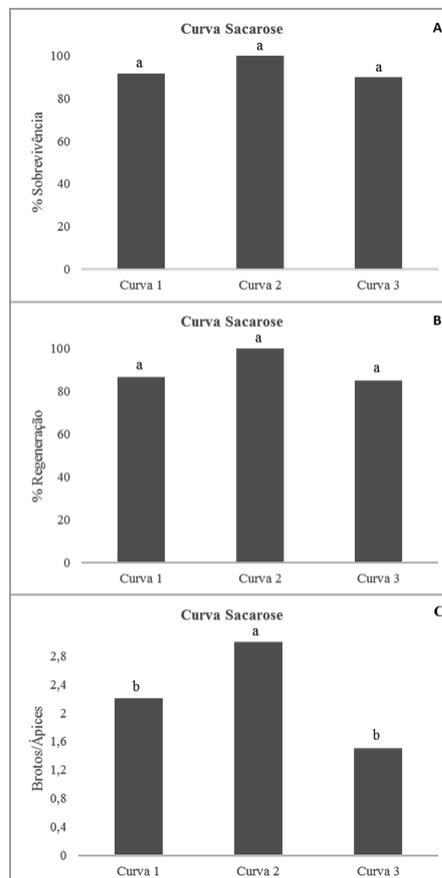
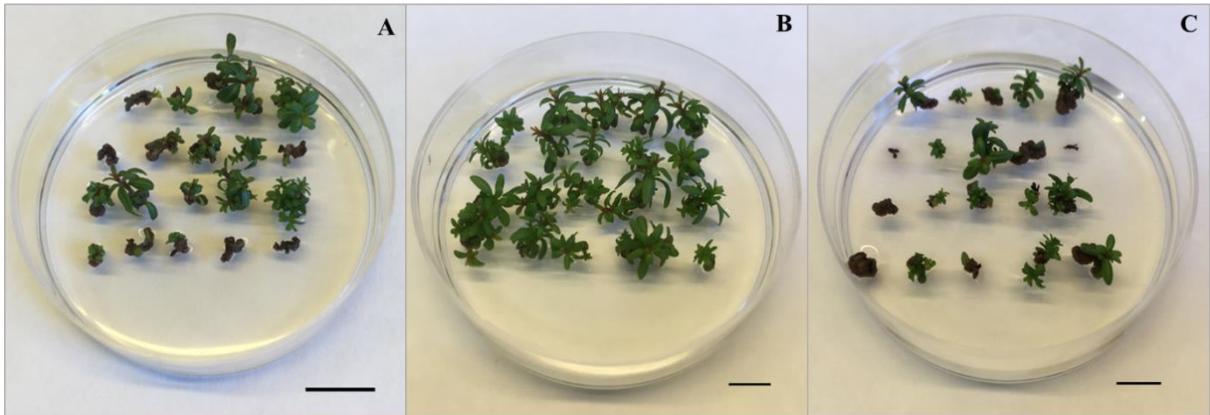


Figura 2 – Aspecto visual dos ápices de *E. grandis* x *E.urophylla* depois de 30 dias do pré-cultivo em sacarose. A - Curva 1: 0,125; 0,25; 0,5; 1 M de sacarose, B - Curva 2: 0,125; 0,25; 0,5 M de sacarose e C - Curva 3: 0,5 M de sacarose. Barra: 1 cm.



### 3.1.2 Otimização dos crioprotetores (curva de crioprotetores)

#### 3.1.2.1 Crioprotetor PVS2

Em um aspecto geral, o crioprotetor PVS2 apresentou os maiores resultados de regeneração, sobrevivência e número de brotos quando comparado ao PVS3 e VSL (FIGURA 6, 9 e 12). Na curva com o crioprotetor PVS2 o método *droplet-vitrification* foi melhor quando comparado à crioplaca (FIGURA 6, 7 e 8), sendo que os tempos de 15 e 30 minutos foram os tratamentos que apresentaram os maiores valores. A porcentagem de sobrevivência para ambos os tempos foi de 100%, a porcentagem de regeneração foi de 91,7% no tempo de 15 minutos e de 92% de sobrevivência para 30 minutos, sendo que não houve diferença estatística entre estes dois tempos. Em relação ao número de brotos, o tempo de 15 minutos apresentou uma média de 3,7 brotos por ápice e 2,6 brotos em 30 minutos (FIGURA 6 A, B, C e 7 A e B).

Também foi observado que quando os ápices foram expostos por 45 minutos ao PVS2, a porcentagem de sobrevivência de ambos os métodos reduziu em relação à 30 minutos, com a *droplet-vitrification* apresentando 33,7% de sobrevivência e a crioplaca 37,5% (FIGURA 6 A e 6 B). Além disso, no método *droplet-vitrification* também houve uma redução da porcentagem de regeneração de 45 a 60 minutos, a qual se manteve até 90 minutos. Enquanto na crioplaca de 45 a 90 minutos a porcentagem de sobrevivência foi estatisticamente igual. Estes resultados podem inferir que em um tempo igual ou superior a 45 minutos o PVS2 apresenta maior toxidez aos ápices de *E. grandis* x *E. urophylla* para ambos os métodos.

Figura 3 – Curva de *E. grandis* x *E. urophylla* utilizando o crioprotetor PVS2 nos tempos 15, 30, 45, 60, 75 e 90 min. A, C e E – Porcentagem de sobrevivência, porcentagem de regeneração e número de brotos por ápice utilizando o método *droplet-vitrification* e B, D e F – Porcentagem de sobrevivência, porcentagem de regeneração e número de brotos por ápice utilizando o método crioplaca. Médias seguidas pelas mesmas letras pertencem ao mesmo grupo pelo teste de *Scott-Knott* ( $p < 0,05$ ).

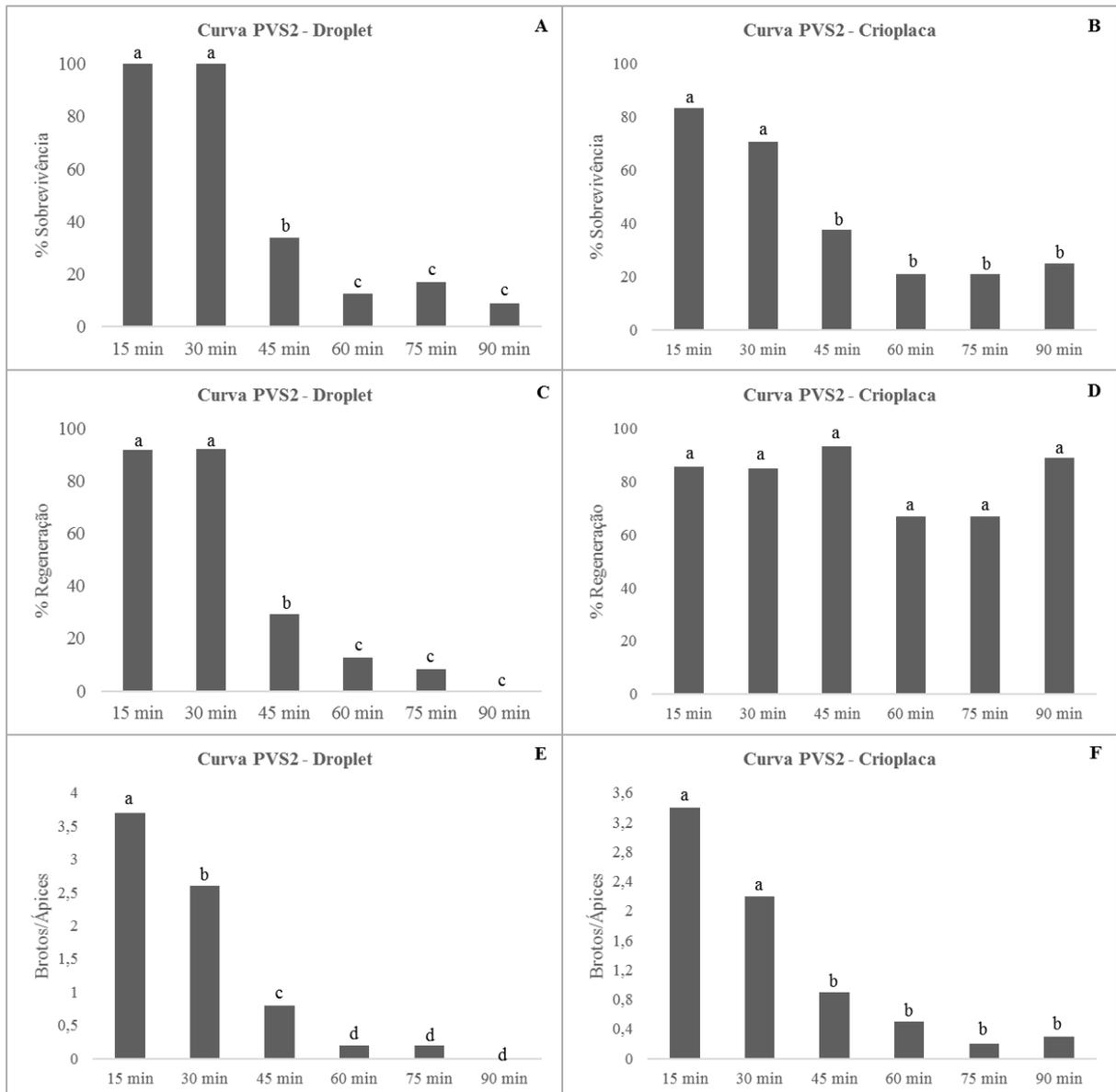


Figura 4 – Aspecto visual dos ápices de *E. grandis* x *E. urophylla* depois de 30 dias da exposição ao crioprotetor PVS2 utilizando o método *droplet-vitrification*. A - 15 min, B - 30 min, C - 45 min, D - 60 min, E - 75 min e F - 90 min. Barra: 1 cm.

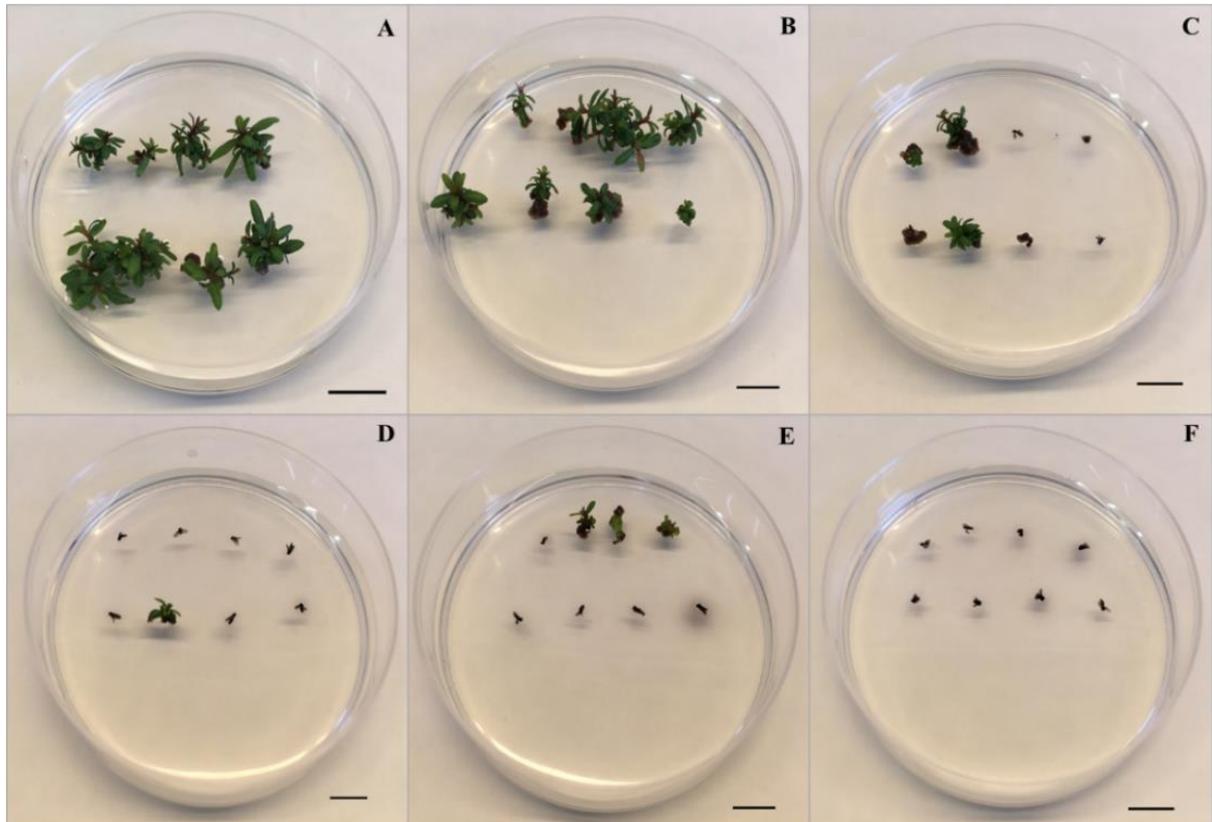
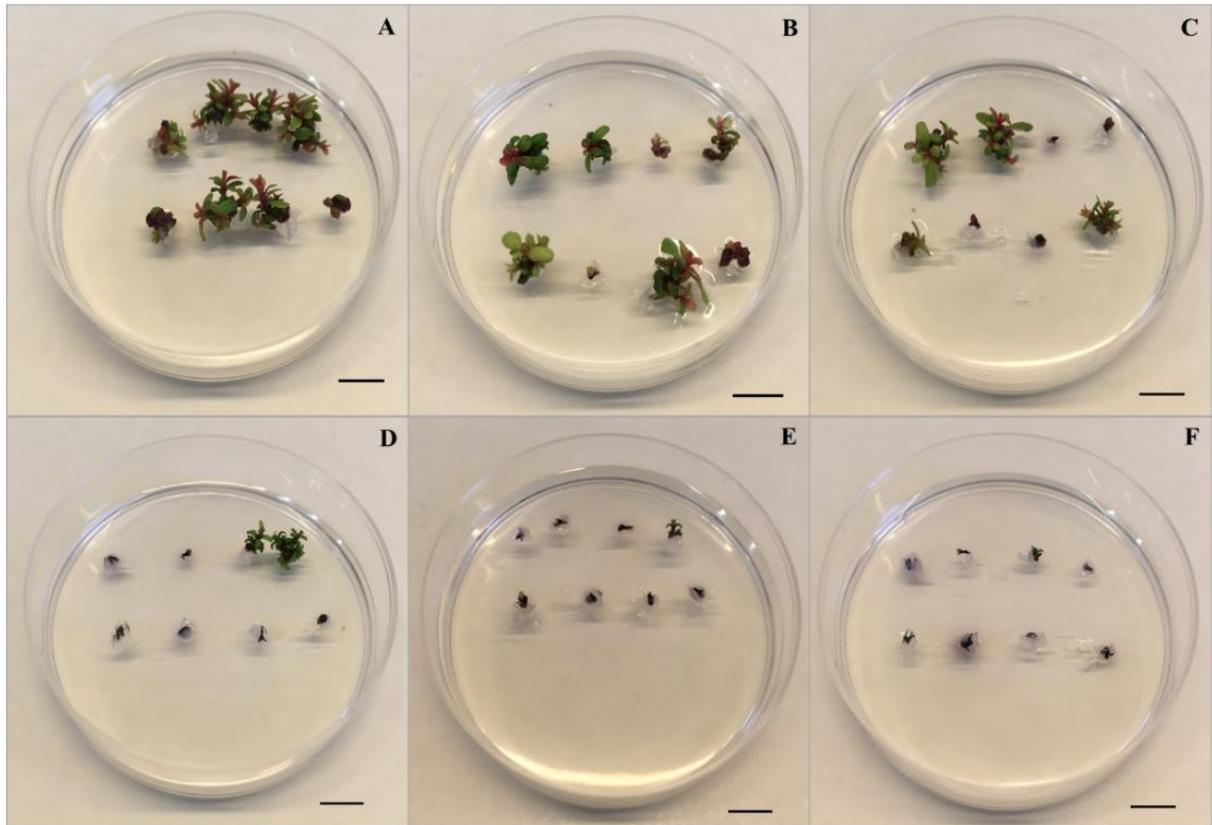


Figura 5 – Aspecto visual dos ápices de *E. grandis* x *E. urophylla* depois de 30 dias da exposição ao crioprotetor PVS2 utilizando o método crioplaca. A - 15 min, B - 30 min, C - 45 min, D - 60 min, E - 75 min e F - 90 min. Barra: 1 cm.



### 3.1.2.2 Crioprotetor PVS3

Quando o PVS3 foi utilizado como crioprotetor foi observado que o método *droplet-vitrification* apresentou os maiores valores de sobrevivência, regeneração e média de brotos, quando comparado ao método da crioplaca (FIGURA 9). Ao contrário da curva com o crioprotetor PVS2, em que 15 e 30 foram considerados os melhores tratamentos, ao utilizar o PVS3 no método *droplet-vitrification*, apenas o tempo de 15 minutos apresentou os melhores resultados, com 95,8% de sobrevivência, 87,5% de regeneração e uma média de 2,5 brotos por ápice caulinar (FIGURA 9 A, C e E).

No método da crioplaca os melhores resultados foram apresentados pelos tempos de 15 e 30 minutos para os três parâmetros avaliados (% de sobrevivência, % de regeneração e média de brotos por ápice), não havendo diferença estatística entre estes dois tempos para nenhum dos parâmetros. No entanto, apesar destes dois tempos apresentarem os melhores valores em relação aos demais, 15 minutos da crioplaca foi bem inferior aos 15 minutos da

*droplet-vitrification*, com uma porcentagem de sobrevivência de 45,8%, 33,3% de regeneração e uma média de 1,1 brotos por ápice (FIGURA 9 B, D e F).

Na *droplet-vitrification*, aos 30 minutos, foi observada uma redução da porcentagem de sobrevivência maior que o dobro daquela alcançada aos 15 minutos, com um valor de 41,7%. Além disso, aos 75 e 90 minutos de exposição ao crioprotetor não foi constatada sobrevivência dos ápices (FIGURA 9 A e 10 E e F). De um modo geral houve uma redução nos valores de todos os parâmetros avaliados no intervalo de 15 a 90 minutos, o que pode indicar uma possível toxicidade do PVS3 com o aumento do tempo de exposição.

Na crioplaca os melhores resultados foram apresentados pelos tempos de 15 e 30 minutos (FIGURA 9 B, D e F e 11). No entanto, comparados ao tempo de 15 minutos da *droplet-vitrification* estes valores foram mais baixos (FIGURA 9 A, C e E) Além disso, a redução da porcentagem de sobrevivência, porcentagem de regeneração e média de brotos foi mais pronunciada aos 45 minutos, com valores de 8,3%, 4,2% e 0,08 respectivamente (FIGURA 9 B, D e F).

Figura 6 – Curva de *E. grandis* x *E. urophylla* utilizando o crioprotetor PVS3 nos tempos 15, 30, 45, 60, 75 e 90 min. A, C e E – Porcentagem de sobrevivência, porcentagem de regeneração e número de brotos por ápice utilizando o método *droplet-vitrification* e B, D e F – Porcentagem de sobrevivência, porcentagem de regeneração e número de brotos por ápice utilizando o método crioplaca. Médias seguidas pelas mesmas letras pertencem ao mesmo grupo pelo teste de *Scott-Knott* ( $p < 0,05$ ).

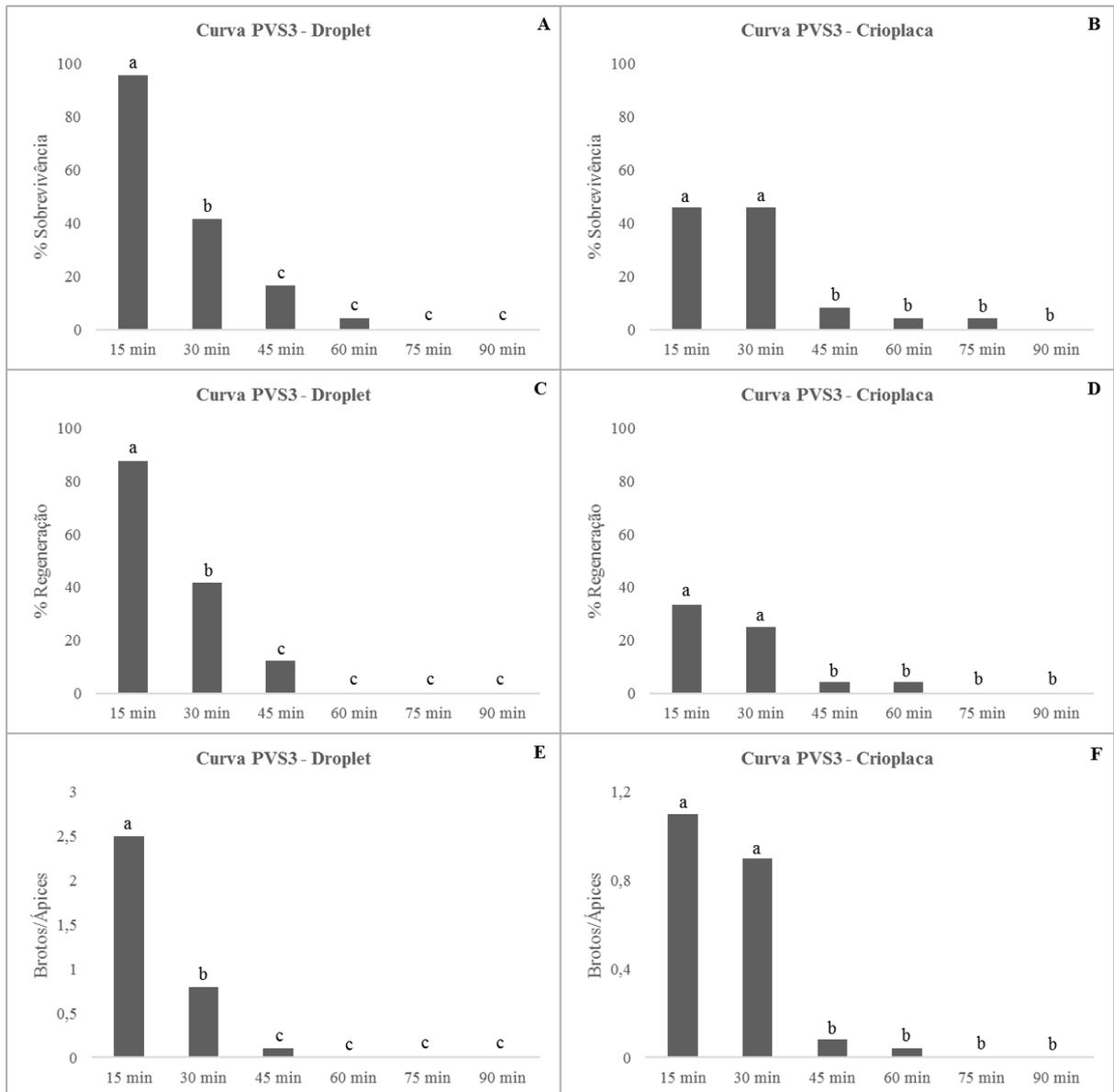


Figura 7 – Aspecto visual dos ápices de *E. grandis* x *E. urophylla* depois de 30 dias da exposição ao crioprotetor PVS3 utilizando o método *droplet-vitrification*. A - 15 min, B - 30 min, C - 45 min, D - 60 min, E - 75 min e F - 90 min. Barra: 1 cm.

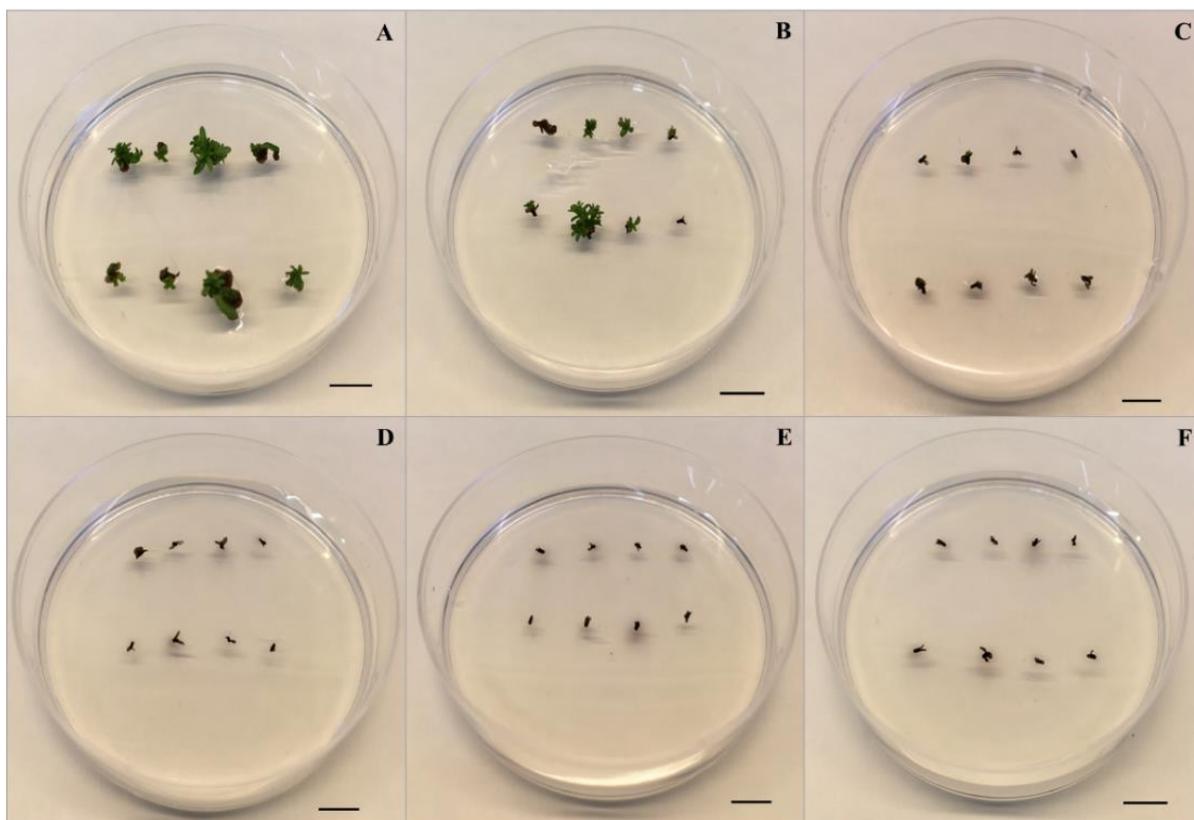
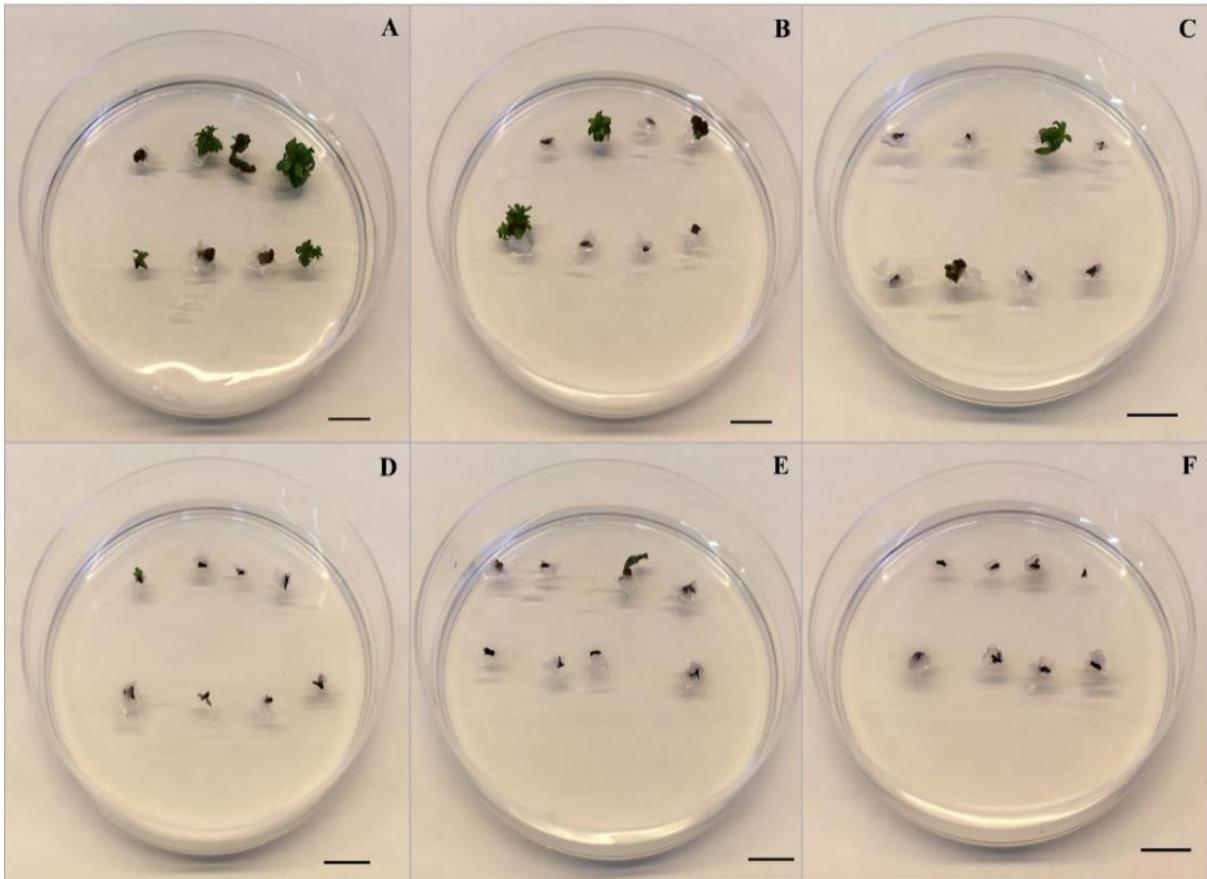


Figura 8 – Aspecto visual dos ápices de *E. grandis* x *E. urophylla* depois de 30 dias da exposição ao crioprotetor PVS3 utilizando o método crioplaca. A - 15 min, B - 30 min, C - 45 min, D - 60 min, E - 75 min e F - 90 min. Barra: 1 cm.



### 3.1.2.3 Crioprotetor VSL

Em relação ao crioprotetor VSL, novamente a *droplet-vitrification* apresentou os melhores resultados quando comparada à crioplaca (FIGURA 12, 13 e 14). O tempo de 15 minutos apresentou os maiores valores em relação aos outros tempos, com 91,6% de sobrevivência, 87,5% de regeneração e uma média de 2,4 brotos por ápice (FIGURA 12 A, C e E). Observou-se que assim como na curva do PVS2, no método *droplet-vitrification*, todos os tempos apresentaram sobrevivência ao usar o VSL, diferente do crioprotetor PVS3 em que nos tempos de 75 e 90 minutos nenhuma sobrevivência foi observada.

Em relação a crioplaca, não houve diferença estatística na porcentagem de sobrevivência nos tempos de 15 e 30 minutos de exposição ao crioprotetor VSL, com 62,5 e 50% de sobrevivência em 15 e 30 minutos respectivamente. Já para a % de regeneração e o número de brotos, 15 minutos de exposição apresentou os melhores resultados, com 45,8% de regeneração e uma média de 1,8 brotos por ápice (FIGURA 12 B, D e F).

Figura 9 – Curva de *E. grandis* x *E. urophylla* utilizando o crioprotetor VSL nos tempos 15, 30, 45, 60, 75 e 90 min. A, C e E – Porcentagem de sobrevivência, porcentagem de regeneração e número de brotos por ápice utilizando o método *droplet-vitrification* e B, D e F – Porcentagem de sobrevivência, porcentagem de regeneração e número de brotos por ápice utilizando o método crioplaca. Médias seguidas pelas mesmas letras pertencem ao mesmo grupo pelo teste de *Scott-Knott* ( $p < 0,05$ ).

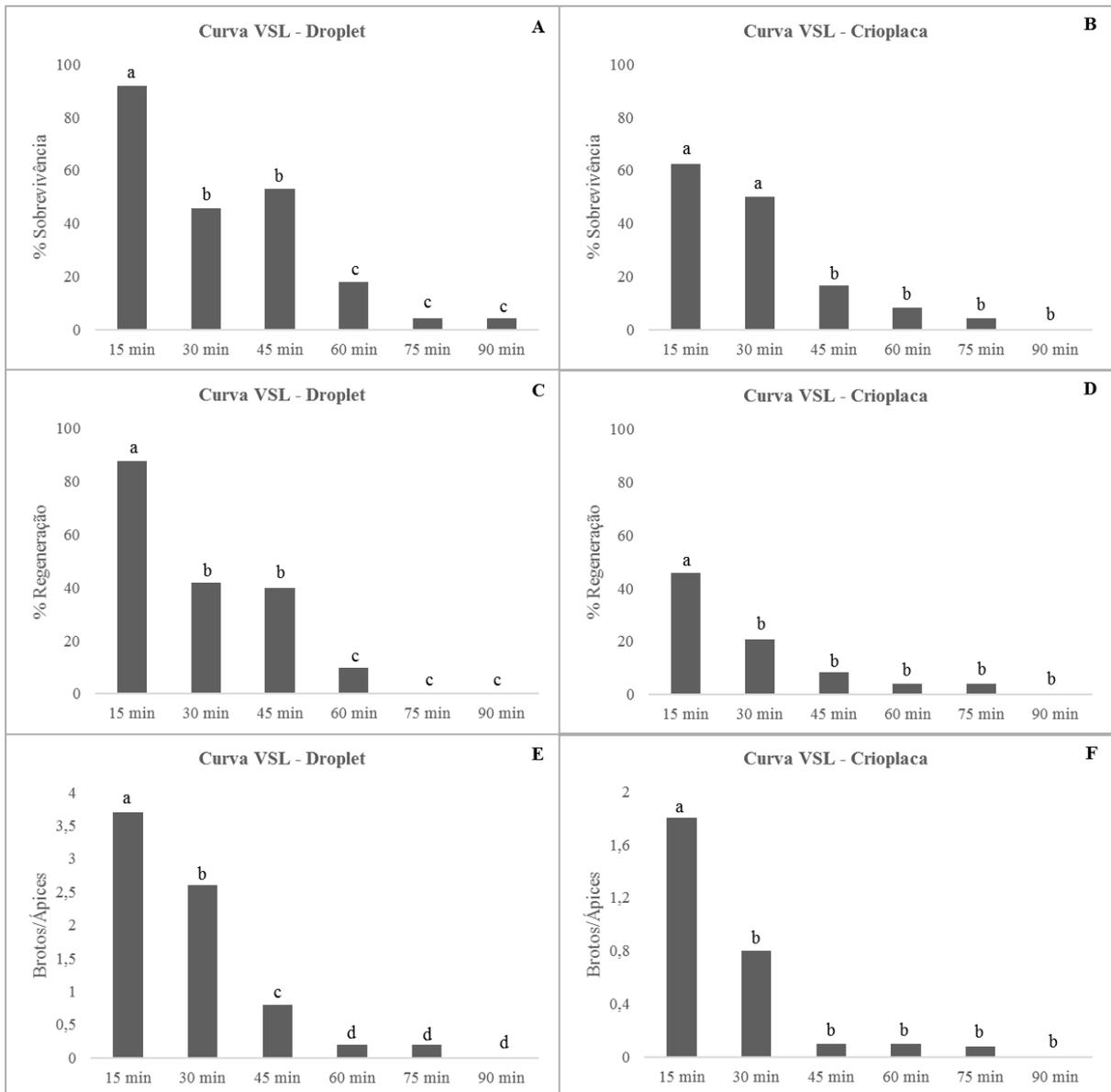


Figura 10 – Aspecto visual dos ápices de *E. grandis* x *E. urophylla* depois de 30 dias da exposição ao crioprotetor VSL utilizando o método *droplet-vitrification*. A - 15 min, B - 30 min, C - 45 min, D - 60 min, E - 75 min e F - 90 min. Barra: 1 cm.

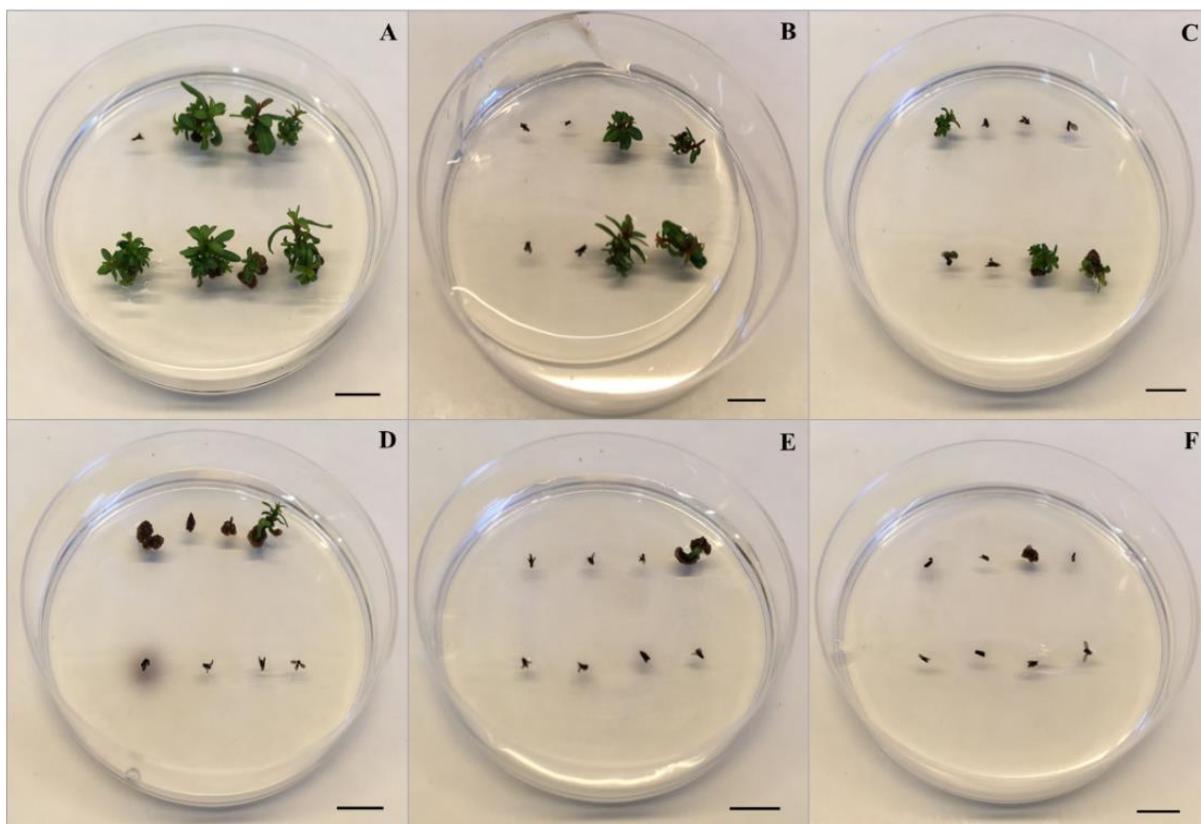
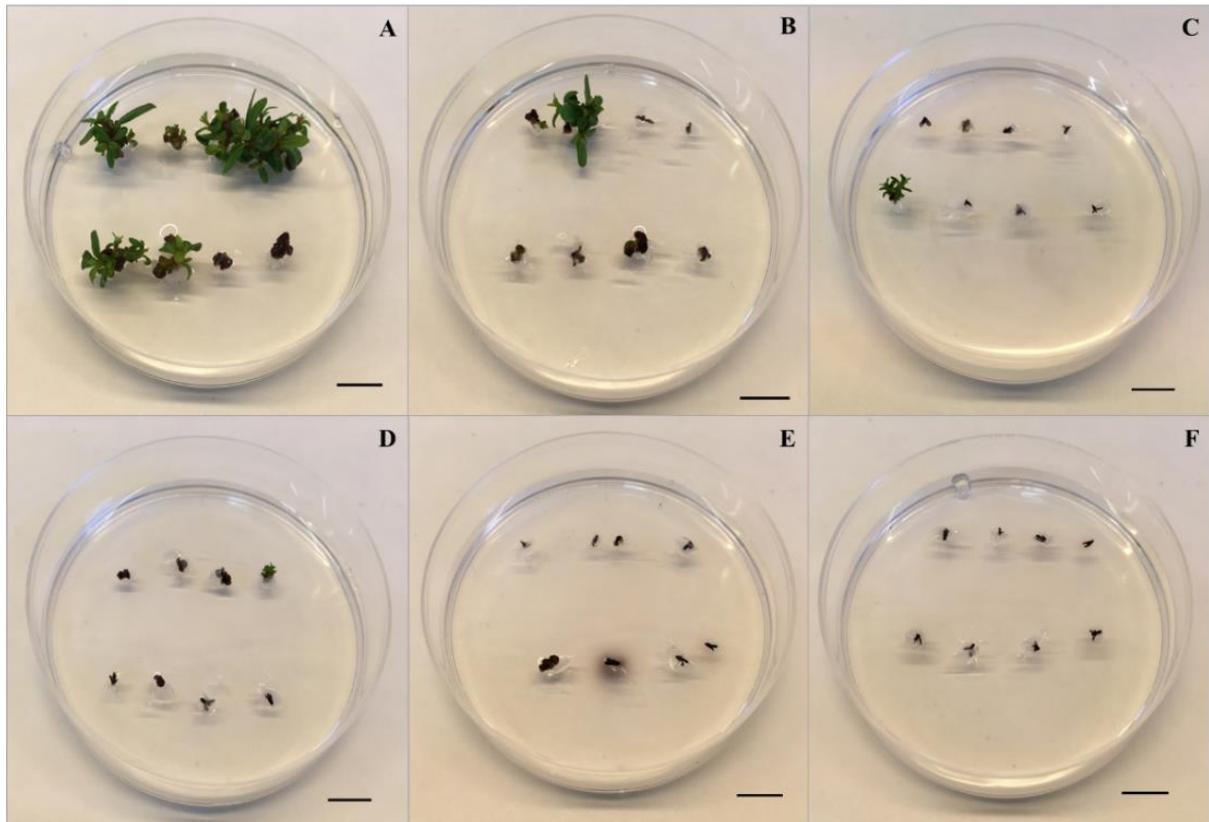


Figura 11 – Aspecto visual dos ápices de *E. grandis* x *E. urophylla* depois de 30 dias da exposição ao crioprotetor VSL utilizando o método crioplaca. A - 15 min, B - 30 min, C - 45 min, D - 60 min, E - 75 min e F - 90 min. Barra: 1 cm.



### 3.1.3 Criopreservação

Ao analisar os gráficos da Figura 15 podemos observar que os tratamentos controle total e controle sacarose não apresentaram diferença estatística em nenhum dos parâmetros avaliados (% de sobrevivência, % de regeneração e média do número de brotos) para ambos os métodos criogênicos (*droplet-vitrification* e crioplaca). Foi observado 100% de sobrevivência do controle total e controle sacarose na *droplet-vitrification* e na crioplaca (FIGURA 15 A e B). A porcentagem de regeneração do controle total e controle sacarose de ambos os métodos criogênicos apresentaram os mesmos valores, com 100% de regeneração do controle total e 93,3% do controle sacarose (FIGURA 15 C e D). A média do número de brotos na *droplet-vitrification* foi de 6,7 para o controle total e 6,8 para o controle sacarose (FIGURA 15 E) e na crioplaca foi ao contrário, com 6,8 para o controle total e 6,7 para o controle sacarose (FIGURA 15 F). Estes resultados demonstram que não houve efeito negativo na sobrevivência e regeneração dos explantes em meio de pré-cultivo com alta concentração de sacarose.

Em relação aos tratamentos não criopreservados ( $LN^-$ ), não houve diferença estatística na porcentagem de sobrevivência entre os tempos avaliados no método *droplet-vitrification*, e estes foram estatisticamente iguais ao controle total e controle sacarose (FIGURA 15 A). Já no método crioplaca o tempo de 60 minutos apresentou menor sobrevivência quando comparado ao tempo de 15 e 30 minutos, que foram estatisticamente iguais (FIGURA 15 B). Em relação a porcentagem de regeneração, os tempos de 15 e 60 minutos foram estatisticamente iguais aos tratamentos controle na metodologia *droplet-vitrification*, e apesar de 30 minutos ter sido diferente estatisticamente dos demais tratamentos, ele ainda apresentou um valor alto de regeneração (76,7%) (FIGURA 15 C). Na crioplaca, todos os tempos avaliados apresentaram resultados inferiores aos controles total e sacarose e o tempo de 60 minutos foi inferior aos demais tempos avaliados, com um valor de 20% (FIGURA 15 D). Quanto a média de brotos não foi observada diferença estatística entre nenhum dos tratamentos no método da *droplet-vitrification* e na crioplaca apesar desta média não ter apresentado diferença estatística entre os três tempos avaliados, elas foram inferiores aos controles. Com os resultados deste experimento podemos inferir que na *droplet-vitrification* o PVS2 não apresentou um efeito citotóxico em nenhum dos tempos de exposição à ele.

Em relação aos ápices criopreservados ( $LN^+$ ) foi observada uma regeneração de 30% para o tempo de 15 e 30 minutos e de apenas 6,7% para o tempo de 60 minutos na metodologia *droplet-vitrification* (FIGURA 15 A e 16 B, D e F). Neste mesmo método, a porcentagem de regeneração foi de 10% para 15 e 30 minutos e de apenas 3,3% para o tempo de 60 minutos e a média do número de brotos foi de 0,1% para todos os tempos avaliados. A crioplaca apresentou 0% de sobrevivência para os tempos avaliados, e conseqüentemente não houve regeneração de brotos. Estes resultados mostram que na metodologia *droplet-vitrification*, apesar dos ápices terem tolerado bem à exposição ao PVS2 nos três períodos de tempo avaliados (15, 30 e 60 minutos), eles demonstraram uma baixa tolerância ao em nitrogênio líquido. E na crioplaca foi observado que a tolerância dos ápices ao PVS2 foi menor quando comparada à *droplet-vitrification* nos explantes que não passaram pelo nitrogênio, e esta foi nula quando os ápices foram expostos ao nitrogênio líquido.

Figura 12 – Criopreservação de *E. grandis* x *E. urophylla* utilizando os métodos *droplet-vitrification* e crioplaca. A, C e E - Porcentagem de sobrevivência, porcentagem de regeneração e número de brotos por ápice utilizando o método *droplet-vitrification* e B, D e F – Porcentagem de sobrevivência, porcentagem de regeneração e número brotos por ápice utilizando o método crioplaca. Médias seguidas pelas mesmas letras pertencem ao mesmo grupo pelo teste de *Scott-Knott* ( $p < 0,05$ ).

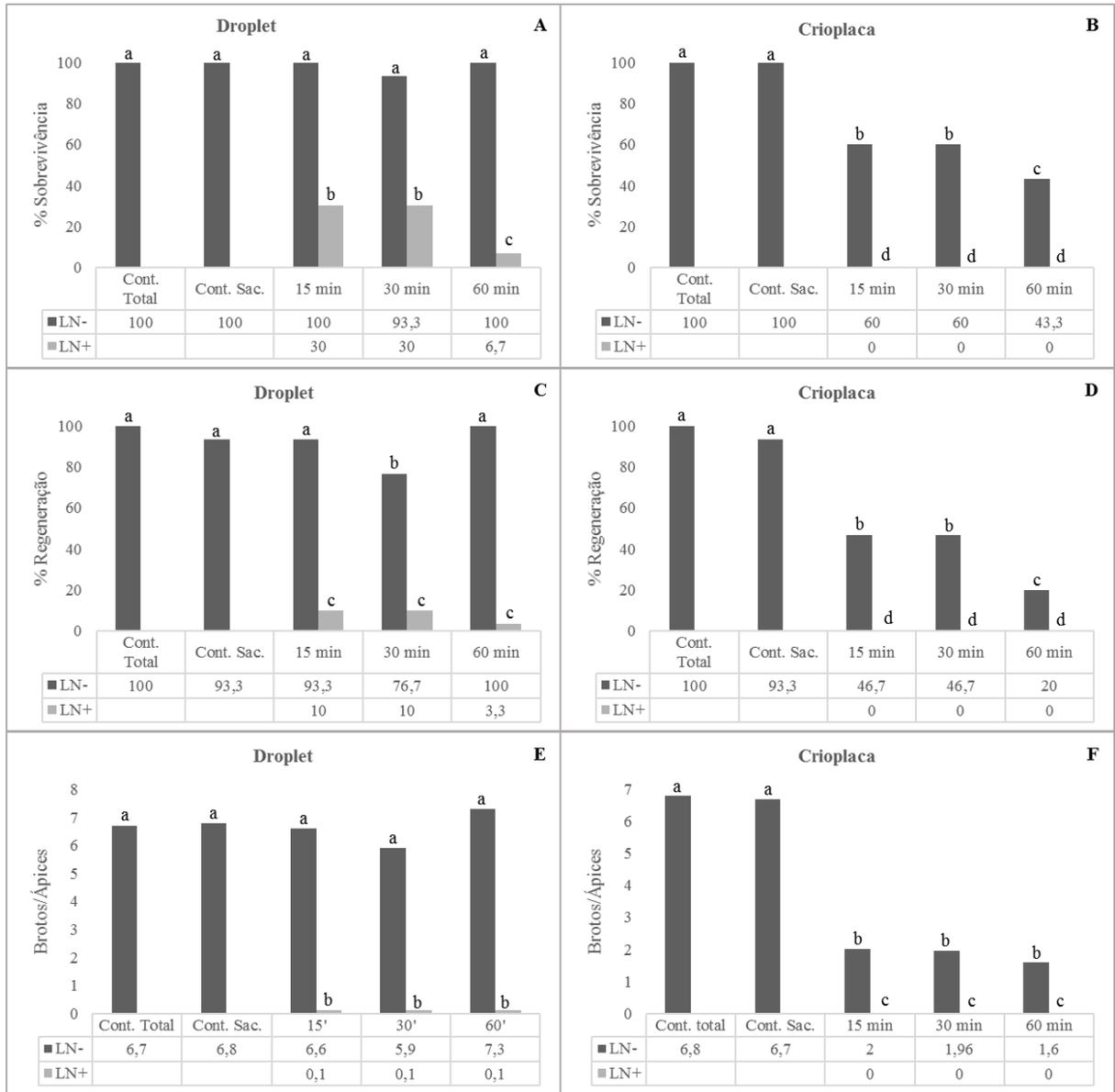
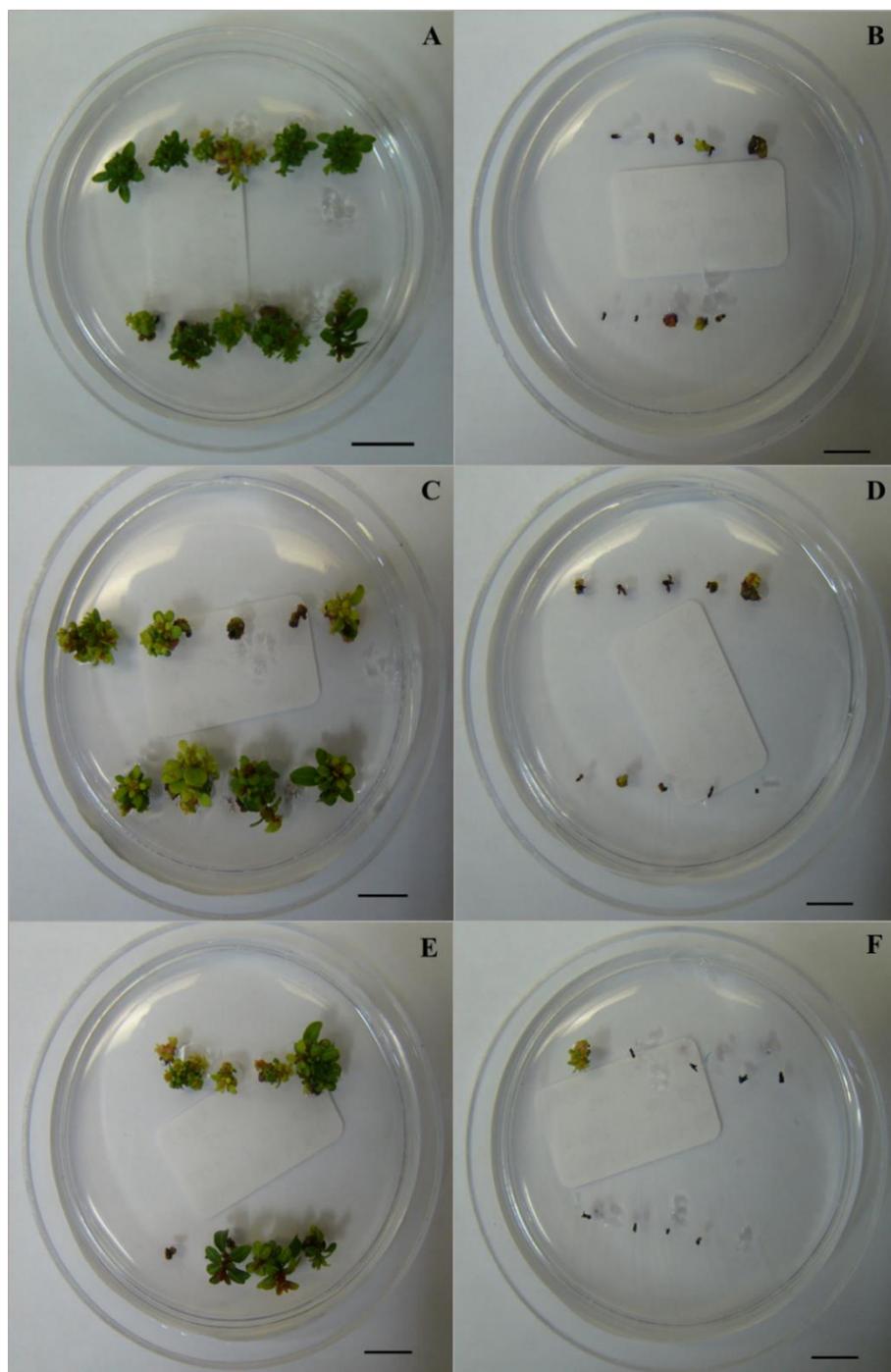


Figura 13 – Aspecto visual dos ápices de *E. grandis* x *E. urophylla* depois de 30 dias da criopreservação. A, C e E – Ápices não criopreservados (LN<sup>-</sup>) expostos a 15, 30 e 60 min ao PVS2 respectivamente e B, D e F – Ápices criopreservados (LN<sup>+</sup>) expostos a 15, 30 e 60 min ao PVS2 respectivamente. Barra: 1 cm.



### 3.2 Experimento 2

Neste experimento, em que foram comparadas duas idades diferentes de fontes de explantes para a criopreservação (brotações com 20 dias e com 3 anos), observou-se que embora o controle total e o controle sacarose tenham sido estatisticamente iguais para ambas as idades, os explantes originados de brotações com 3 anos apresentaram um valor um pouco menor que os originados de brotações com 20 dias (FIGURA 17, 18). Este resultado sugere que o pré-cultivo com sacarose não foi prejudicial para nenhuma das fontes de explante.

O tratamento LN<sup>-</sup> das brotações com 3 anos apresentou uma porcentagem de sobrevivência de apenas 16%, sendo este um valor bem inferior ao apresentado pelo tratamento LN<sup>-</sup> das brotações com 20 dias, no qual foi de 96% de sobrevivência (FIGURA 17). A maturidade fisiológica das brotações com 3 anos, associadas à soma dos estresses sofrido pelos explantes submetidos ao pré-cultivo e ao PVS2 pode explicar o valor de sobrevivência mais baixo destes explantes.

Nos tratamentos criopreservados (LN<sup>+</sup>) foi observado uma porcentagem de regeneração de 48% dos ápices provenientes de plantas com 20 dias, enquanto para os ápices provenientes de brotações com 3 anos a sobrevivência foi nula (FIGURA 17). Estes resultados mostraram que os explantes provenientes de brotações com 3 anos apresentaram uma maior sensibilidade às etapas do processo de criopreservação quando comparados aos explantes provenientes de brotações com 20 dias. Podendo-se inferir que a série de estresses sofridas pelos explantes durante a criopreservação culminou com a anulação da sobrevivência dos ápices provenientes de brotações com 3 anos, após a passagem deles pelo nitrogênio líquido.

Figura 14 – Porcentagem de sobrevivência dos ápices caulinares de *E. grandis* provenientes de brotações com 20 dias e brotações com 3 anos de idade. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de *Scott-Knott* ( $p < 0,05$ ).

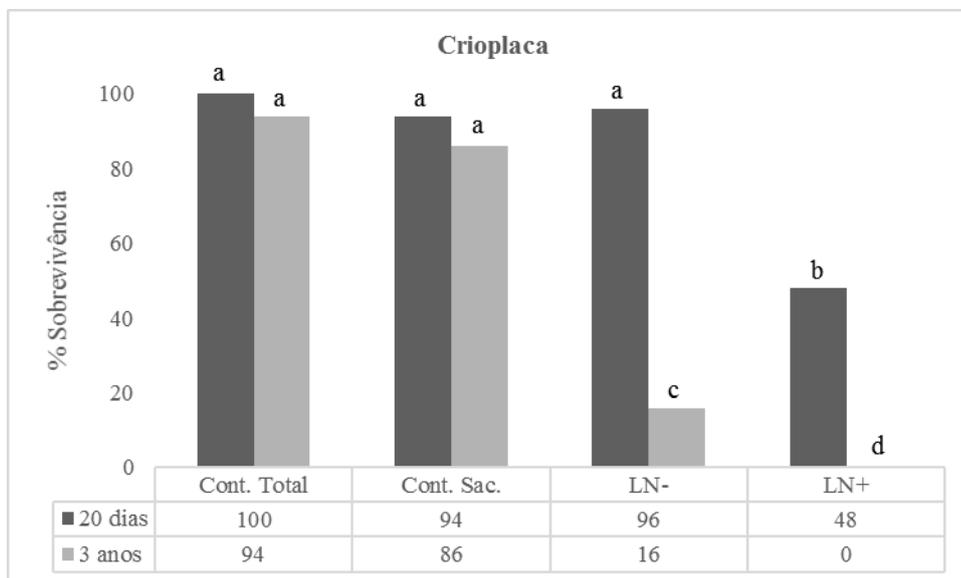
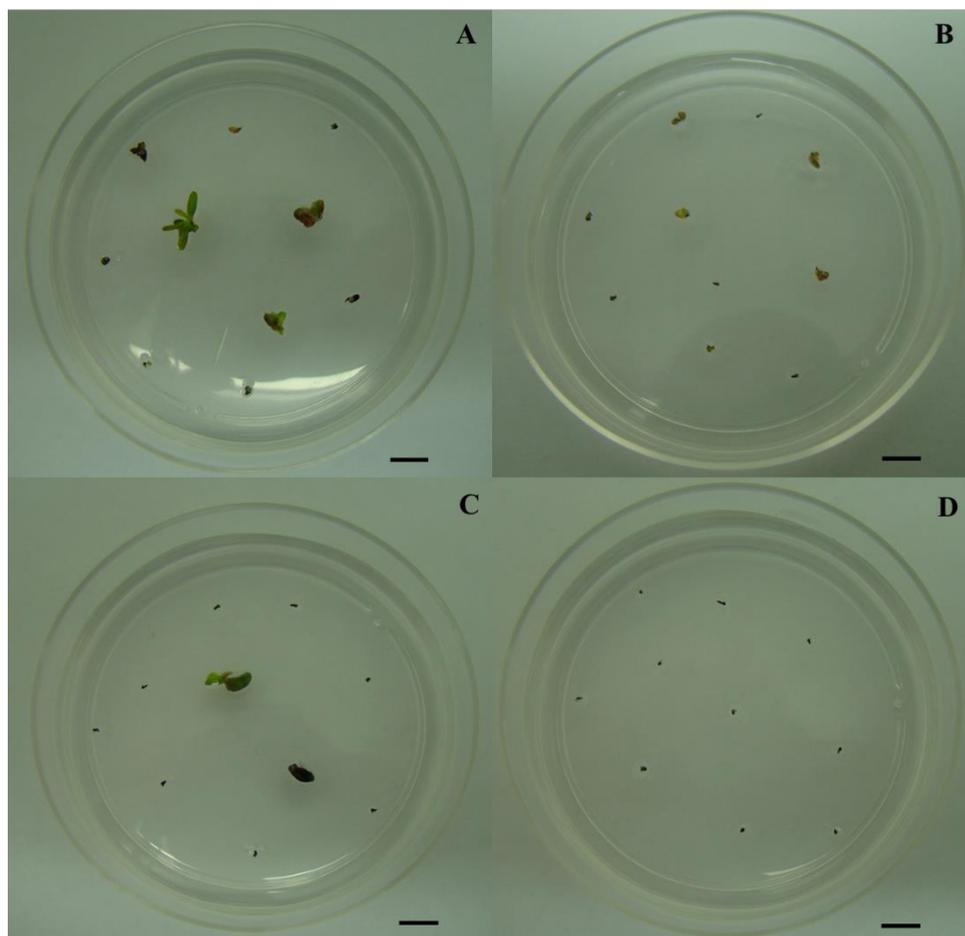


Figura 15 – Aspecto visual dos ápices de *E. grandis* provenientes de brotações com 20 dias e 3 anos de idade depois de 30 dias da criopreservação. A – Ápices não criopreservados ( $LN^-$ ) aos 20 dias, B – Ápices criopreservados ( $LN^+$ ) aos 20 dias, C – Ápices não criopreservados ( $LN^-$ ) aos 3 anos e D – Ápices criopreservados ( $LN^+$ ) aos 3 anos. Barra: 1 cm.



## 4 DISCUSSÃO

Entre todas as estratégias de conservação existentes, a criopreservação é atualmente considerada como uma forma segura e econômica de armazenamento de recursos genéticos à longo prazo, podendo ser utilizada como um *backup* em programas de transformação genética, enquanto ensaios de campo são realizados (PADAYACHEE et al., 2009).

Um passo muito importante nos protocolos de criopreservação é o pré-cultivo dos explantes em meios com a presença de agentes osmóticos. Esta estratégia tem como finalidade aumentar a recuperação dos explantes depois da criopreservação. Isto ocorre porque estes agentes osmóticos atuam na desidratação da célula, fazendo com esta perca água para o meio externo o que evita a formação de cristais de gelo durante o congelamento e o aquecimento (ZHU et al., 2006). Além disso, a produção endógena de compostos crioprotetores pelas células que passam pelo pré-cultivo, aumentam a tolerância das plantas ao processo de dessecação e criopreservação (KULUS; ZALEWSKA, 2014; PADAYACHEE et al., 2009). A sacarose é um agente osmótico muito utilizado nos meios de pré-cultivo. Segundo Grapin et al. (2007) e Halmagyi e Pinker (2006), a desidratação osmótica por meio de carboidratos, como a sacarose, estimulam uma melhor resistência à dessecação e ao efeito tóxico de alguns crioprotetores do que outros agentes osmóticos.

No presente trabalho, foram testadas três curvas de sacarose para o pré-cultivo dos ápices de eucalipto. Foi observado, que o clone de eucalipto estudado aqui tolerou uma concentração de sacarose até 1 M, porém o número de brotos produzidos pelas pelos ápices que passaram por esta concentração de sacarose foi menor em relação aos ápices cultivados em meio de cultura com até 0,5 M de sacarose. Outro ponto observado neste trabalho foi que o híbrido *E. grandis* x *E. urophylla* foi mais tolerante quando submetido à meios com concentrações crescentes de sacarose (24 h em cada concentração), do que quando submetido à uma única concentração por um período de tempo maior (48 h).

Kaya et al. (2013) observaram que ao utilizaram uma concentração de sacarose até 1,2 M no pré-cultivo de uma linhagem de *E. grandis* X *E.urophylla* o número de ápices regenerados caiu drasticamente quando comparado ao controle sem sacarose. Estes mesmos autores observaram que ápices caulinares de *E. grandis* X *E.urophylla* são sensíveis à alta concentração de sacarose (>0,625 M), mesmo com um aumento progressivo deste açúcar.

Santos et al. (2015) observaram que o pré-cultivo de ápices caulinares em meio de cultura com 0,3 M de sacarose resultou em aumento da recuperação de brotos de *Harconia speciosa* criopreservados quando comparados com ápices que não passaram pelo pré-cultivo.

Segundo Panis et al. (1996) a sacarose não só promove redução no conteúdo de água por desidratação (efeito osmótico), como também reduz o ponto de congelamento da água dentro do tecido, além disso a sacarose tem o papel de proteção das membranas durante o congelamento (CARPENTIER et al., 2010).

O método de vitrificação foi desenvolvido por Sakai et al. (2000) e tem sido utilizado para várias espécies vegetais (MATSUMOTO, 2017). Com o passar dos anos várias tentativas de desenvolver soluções de vitrificação que atendam a grande diversidade de material vegetal a serem criopreservados têm sido realizadas (SUZUKI et al., 2008). Entre estas soluções o PVS2, combinado com pré-cultivo e/ou pré-incubação (*loading solution*), tem sido utilizado com maior frequência na criopreservação de ápices caulinares vegetais (KAYA et al., 2013; ROMADANOVA; KUSHNARENKO; KUSHNARENKO, 2017; SANTOS et al., 2015; VOLK et al., 2017).

Neste trabalho, foi observado na *droplet-vitrification* que apesar dos 3 crioprotetores utilizados apresentarem comportamento similar no tratamento de 15 minutos, com alta porcentagem de sobrevivência, regeneração e número de brotos, aos 30 minutos apenas o PVS2 manteve bons resultados dos parâmetros avaliados quando comparado com o PVS3 e o VSL. Já na crioplaca a taxa de sobrevivência, regeneração e número de brotos aos 15 e 30 minutos foi tão alta quanto na *droplet-vitrification* apenas quando foi utilizado o crioprotetor PVS2, sendo que o uso do PVS3 e VSL na crioplaca apresentou resultados inferiores quando comparados com a *droplet-vitrification* nos tempos de 15 e 30 minutos.

O principal problema em relação às soluções de vitrificação está relacionado com a alta toxidez de alguns de seus componentes e pelo fato destas soluções geralmente serem espécie específicas (SUZUKI et al., 2008; VUJOVIĆ et al., 2011). O crioprotetor PVS2 apresenta como característica sua alta toxidez química devido a presença de crioprotetores penetrantes como DMSO e etilenoglicol. O PVS3, no qual possui em sua composição sacarose e glicerol, tem sido usado como uma alternativa para criopreservação de espécies sensíveis ao PVS2 (KIM et al., 2009).

Porém, neste estudo foi observado que na *droplet-vitrification* a partir de 30 minutos, o PVS3 foi mais tóxico ao eucalipto do que o PVS2, exibindo menor % de sobrevivência, regeneração e número de brotos. Enquanto na crioplaca todos os parâmetros avaliados foram considerados baixos na curva do PVS3 em todos os tempos testados, inclusive no tratamento de 15 minutos. Isso pode ser compreendido pela alta concentração de sacarose presente nesta solução, visto que enquanto o PVS2 apresenta 13,7% de sacarose o PVS3 apresenta 50%, o

que corresponde à 1,5 M de sacarose, concentração considerada tóxica para *E. grandis* X *E. urophylla*, segundo o trabalho de Kaya et al. (2013).

Em *Cleome rosea*, uma espécie herbácea brasileira, a criopreservação de ápices caulinares apresentou sucesso quando se utilizou tanto PVS2 quanto PVS3 como crioprotetores, alcançando taxas de sobrevivência de 97% para PVS2 e de 70% para PVS3 (CORDEIRO et al., 2015).

De um modo geral o PVS2 também foi melhor que o VSL neste trabalho. A solução crioprotetora VSL contém em sua composição cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ), composto químico adicionado à solução com o intuito de fornecer maior estabilidade e integridade das membranas no processo de congelamento e descongelamento das células vegetais (SUZUKI et al., 2008). Porém neste trabalho, a adição do  $\text{CaCl}_2$  não resultou em efeitos benéficos para os ápices criopreservados.

O tempo de incubação que o explante permanece em contato com a solução de vitrificação também deve ser levado em consideração, sendo necessário determiná-lo precisamente a fim de encontrar um balanço correto entre a toxidez da solução e o nível de crioproteção necessário para reduzir a formação de cristais de gelo nos tecidos criopreservados (VUJOVIĆ et al., 2011). Neste estudo foi observado que o aumento do tempo de exposição ao crioprotetor diminuiu drasticamente a sobrevivência dos ápices após a criopreservação, mostrando o efeito tóxico que os componentes dos crioprotetores podem causar aos tecidos submetidos à eles.

Kaya et al. (2013) ao testarem 15, 30, 45 e 60 minutos de incubação em PVS2 em 5 linhagens de eucalipto observaram que 60 minutos de exposição à este crioprotetor apresentou os melhores resultados, com 43 a 83% de sobrevivência dos ápices após a criopreservação. Estes valores, segundo os autores, estão acima do padrão mínimo estabelecido por eles em laboratório como sendo seguro para o estabelecimento de bancos de genes, que é de 40% de sobrevivência.

Além do tempo de exposição foi visto que a temperatura em que os explantes são expostos ao PVS2 pode influenciar muito na taxa de recuperação depois da criopreservação. Meristemas de wassabi (*Wasabia japonica*) a 0°C toleraram a exposição ao PVS2 até 50 min, apresentando uma alta taxa de recuperação de brotos depois da criopreservação, enquanto à 25°C a taxa de recuperação de brotos caiu drasticamente depois de 10 minutos de exposição ao PVS2 (MATSUMOTO; SAKAI; YAMADA, 1994). Em temperaturas baixas a mobilidade molecular é reduzida e a penetração dos crioprotetores pelas membranas é mais lenta, o que

pode ocasionar em um menor efeito tóxico. Além disso, temperaturas mais baixas previnem uma desidratação excessiva das células (VOLK et al., 2006).

Em relação ao método criogênico, a *droplet-vitrification* apresentou 30% de sobrevivência nos tratamentos de 15 e 30 minutos dos ápices criopreservados, sendo esta a maior porcentagem de sobrevivência apresentada pelos ápices que foram criopreservados. Já na crioplaca não houve regeneração dos ápices em nenhum dos três tratamentos (15, 30 e 60 minutos) depois da criopreservação. Apesar da sobrevivência de 30% apresentada pelo método *droplet-vitrification* a porcentagem de regeneração neste método em ambos os tratamentos de 15 e 30 minutos foi de apenas 10%. Ao contrário do presente estudo, em dois diferentes genótipos de cereja (*Prunus cerasifera* Ehrh. e *Prunus domestica* L.) as porcentagens de regeneração dos explantes criopreservados pelo método V-crioplaca foram mais que o dobro daquele alcançado com o método *droplet-vitrification* (VUJOVIĆ et al., 2011; VUJOVIĆ et al., 2015).

Salma et al. (2014) ao compararem os métodos *droplet-vitrification* e D-crioplaca na criopreservação de duas variedades de *Phoenix dactylifera* observaram que na variedade Sultany a porcentagem de regeneração foi maior na *droplet-vitrification*, com 84% quando comparada à D-crioplaca, que apresentou uma regeneração de 47,5%. Segundo estes autores a matriz de alginato de sódio, que encapsula os explantes, diminui a desidratação causada pela exposição à LS (*loading solution*) em comparação com os explantes que estão em contato direto com a LS no método da *droplet-vitrification*. Tendo em conta que no experimento 1 deste trabalho não foi utilizado LS, podemos inferir que a matriz de alginato possa ter diminuído a penetração do crioprotetor no interior das células, levando a uma proteção ineficiente do crioprotetor às células a serem criopreservadas.

O método *droplet-vitrification* também foi aplicado com sucesso em espécies de Citrus, proporcionando uma recuperação de até 100% para ápices caulinares de *Citrus medica* (VOLK et al., 2017). Santos et al. (2015) utilizaram a *droplet-vitrification* na criopreservação de *Harconia speciosa* e alcançaram uma recuperação dos ápices próxima à 90%. Em *Fagus sylvatica*, eixos embriônicos criopreservados apresentaram sobrevivência de 70% (NUC; MARSZALEK; PUKACKI, 2016).

Em eucalipto a *droplet-vitrification* resultou melhor resposta ao ser comparada com o método *encapsulation-dehydration*. Enquanto uma linhagem de *E. grandis* X *E. urophylla* apresentou uma sobrevivência de 58% ao ser criopreservada por meio do método *droplet-vitrification*, a mesma linhagem ao ser criopreservada pelo método *encapsulation-dehydration*

não obteve sucesso, sendo que nenhum explante sobreviveu depois da criopreservação (KAYA et al., 2013).

Em relação ao experimento 2, os resultados mostraram claramente que a idade interferiu na sobrevivência dos ápices após a criopreservação, visto que aqueles que vieram de brotações com 20 dias apresentaram uma porcentagem de regeneração de 48%, valor este acima do considerado seguro para o estabelecimento de um banco criogênico (UCHENDU; REED, 2008), enquanto os provenientes de brotações com 3 anos não apresentaram nenhuma regeneração.

A escolha do material é um passo muito importante no processo de criopreservação. O material selecionado deve ser o mais jovem e meristemático possível. As células deste tipo de material provavelmente são mais tolerantes ao congelamento por serem pequenas, possuírem vacúolos pequenos e em pequenos números (contendo, portanto pouca água), além de apresentarem um citoplasma denso e a relação núcleo-citoplasma ser alta (ENGELMANN, 1991; KULUS; ZALESKA, 2014). Para Andrade (2002), a fonte de explante é muito importante no sucesso da regeneração *in vitro*, isto porque a capacidade de regeneração depende da maturidade, estágio fisiológico e do tecido que será utilizado.

Para Popova et al. (2010), a idade ideal para a criopreservação de ápices caulinares é de 2 semanas. Ápices caulinares de plantas mais velhas são mais difíceis de isolar devido o maior número de folhas cobrindo estes ápices, fato este observado no presente estudo. Porém, em *Colocasia esculenta* L. Schott, plantas mãe com 2-3 meses de idade foram consideradas como melhor opção para a criopreservação (TAKAGI et al., 1997).

## 5 CONCLUSÕES

Para o híbrido *E. grandis* x *E. urophylla*, os parâmetros otimizados de meio de pré-cultivo, tipo de crioprotetor, tempo de exposição à ele e método criogênico não apresentaram porcentagem de sobrevivência considerada como ideal para o estabelecimento de um banco criogênico.

Para *E. grandis* foi observado que a idade dos explantes tem influência no resultado final da criopreservação. Plantas com 20 dias apresentaram 48% de sobrevivência após a criopreservação e plantas com 3 anos apresentaram ausência de sobrevivência.

## REFERÊNCIAS

- AHN, C. H., Choi YE (2017). In vitro clonal propagation and stable cryopreservation system for *Platyclusus orientalis* via somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Nova Iorque, v. 131, p. 513–523.
- CARNEROS, E. et al. Effect of different cryoprotectant procedures on the recovery and maturation ability of cryopreserved *Pinus pinea* embryogenic lines of different ages. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, Berlim, v. 53, p. 469–477, 2017.
- CARPENTIER, S. C. et al. Sugar-mediated acclimation: the importance of sucrose metabolism in meristems. **Journal of Proteome Research**, Washington, v. 9, n. 10, p. 5038-5049, 2010.
- CORDEIRO, L. da S. et al. Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of *Cleome rosea* Vahl (Cleomaceae) using the V cryo-plate technique. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, Berlim, v. 51, n. 6, p. 688–695, 2015.
- CORREIA, D. et al. Efeito do meio de cultura líquido e sólido no crescimento e desenvolvimento de gemas de *Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus urophylla* na multiplicação in vitro. **IPEF**, Piracicaba, n. 48/49, p. 107-116, 1995.
- DIXIT, S. et al. Cryopreservation: A potential tool for long-term conservation of medicinal plants. In: SRIVASTAVA, P. S.; NARULA, A.; SRIVASTAVA, S. (Org.). **Plant Biotechnology and Molecular Markers**. Nova Deli: Anamaya Publishers, 2004. p. 278-288.
- DUMET, D. et al. Effect of various sugars and polyols on the tolerance to desiccation and freezing of oil palm polyembryonic cultures. **Seed Science Research**, Cambridge, v. 4, n. 3, p. 307–313, 1994.
- ENGELMANN, F. Cryopreservation of plant species: progress and prospects. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, Berlim, v. 40, p. 427–433, 2004.
- ENGELMANN, F. Effects of freezing in liquid nitrogen on the properties of a soybean (*Glycine max* L. var. acme) callus strain used as a bioassay for cytokinin activity. **Cryo letters**, Lewes, v. 13, p. 331–336, 1992.
- ENGELMANN, F. In vitro conservation methods. In: CALLOW, J. A.; FORD LLOYD, B. V.; NEWBURY, J. H. **Biotechnology and plant genetic resources**. Wallingford: CAB International, 1997. p. 119-162.
- ENGELMANN, F. *In vitro* conservation of tropical plant germplasm - a review. **Euphytica**, Berlim, v. 57, p. 227-243, 1991.
- FERREIRA, D. F. Sisvar 4.3 **Sistema de Análises Estatísticas**. Lavras: UFLA, 1999.
- GRAPIN, A. et al. Histo-cytological changes in *Pelargonium* apices during the cryopreservation process: effect of the osmotic agent chosen for the preculture step. **Acta Horticulturae**, Lovaina, v. 760, p. 195–201, 2007.

- HALMAGYI, A.; PINKER, I. Plant regeneration from *Rosa* shoot tips cryopreserved by a combined droplet vitrification method. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Nova Iorque, v. 84, n.2, p. 145-153, 2006.
- KAYA, E. et al. Cryopreservation of *Eucalyptus* genetic resources. **Cryo Letters**, Lewes, v. 34, n. 6, p. 608–618, 2013.
- KIM, H. et al. Development of alternative loading solutions in droplet-vitrification procedures. **Cryo Letters**, Lewes, v. 30, n. 3, p. 291–299, 2009.
- KULUS, D.; ZALEWSKA, M. Cryopreservation as a tool used in long-term storage of ornamental species - A review. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 168, p. 88–107, 2014.
- LI, J-W. et al. Cryobiotechnology of forest trees: recent advances and future prospects. **Biodiversity and Conservation**, Berlim, v. 27, p. 795–814, 2018.
- LLOYD, G. B.; MCCOWN, B. H. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel (*Kalmia latifolia*) by use of shoot tip culture. Proceedings of the International Plant Propagator's Society, Carlisle, v. 30, p. 421–437, 1980.
- MATSUMOTO, T. Cryopreservation of Plant Genetic Resources: Conventional and New Methods. **Reviews in Agricultural Science**, Tottori, v. 5, n. 0, p. 13–20, 2017.
- MATSUMOTO, T.; SAKAI, A.; YAMADA, K. Cryopreservation of *in vitro*-grown apical meristems of wasabi (*Wasabiajaponica*) by vitrification and subsequent high plant regeneration. **Plant Cell Reports**, Berlim, v. 13, p. 442-446, 1994.
- MÁXIMO, W. P. F. et al. Nitrate (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) and ammonium (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) ratios for propagation of *Eucalyptus* hybrid in two different *in vitro* cultivation systems. **Australian Journal of Crop Science**, Brisbane, v. 9, n. 12, p. 1242-1248, 2015.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Nova Jersey, v. 15, p. 473 - 497, 1962.
- NAIRN, B. J. Commercial micropropagation of radiata pine. In: AHUJA, M. R. (Org.) **Micropropagation of woody plants**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1993. p. 383–394.
- NIINO, T. et al. Dehydration Improves Cryopreservation of Mat Rush (*Juncus decipiens* Nakai) Basal Stem Buds on Cryo-plates. **Cryo Letters**, Lewes, v. 34, n. 6, p. 549–560, 2013.
- NUC, K.; MARSZALEK, M.; PUKACKI, P. M. Cryopreservation changes the DNA methylation of embryonic axes of *Quercus robur* and *Fagus sylvatica* seeds during in vitro culture. **Trees**, Upsália, v. 30, p. 1831-1841, 2016.
- PADAYACHEE, K. et al. Cryopreservation as a tool for the conservation of *Eucalyptus* genetic variability: concepts and challenges. **Southern Forests: a Journal of Forest Science**, Oxfordshire, v. 71, n. 2, p. 165-170, 2009.

PANIS, B.; et al. Cryopreservation of banana (*Musa* spp.) meristem cultures after preculture on sucrose. **Plant Science**, Amsterdam, v. 121, n. 1, p. 95-106, 1996.

POPOVA, E.; KIM, H. H.; PAEK, K. Y. Cryopreservation of coriander (*Coriandrum sativum* L.) somatic embryos using sucrose preculture and air desiccation. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 124, p. 522–528, 2010.

PUKACKI, P. M.; JUSZCZYK, K. Desiccation sensitivity and cryopreservation of the embryonic axes of the seeds of two *Acer* species. **Trees**, Upsália, 29: 385-396, 2015.

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

REED, B. M. Cryopreservation of Bermudagrass Germplasm by Encapsulation Dehydration. **Plant Genetic Resources**, Cambridge, v. 46, p. 6–11, 2006.

ROMADANOVA, N.; KUSHNARENKO, S.; KARASHOLAKOVA, L. Development of a common PVS2 vitrification method for cryopreservation of several fruit and vegetable crops. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, Tamil Nadu, v. 53, p. 382–393, 2017.

SAKAI, A.; KOBAYASHI, S.; OIYAMA, I. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 9, n. 1, p. 30-33, 1990.

SALMA, M. et al. Comparison of droplet-vitrification and D-cryoplate for cryopreservation of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) polyembryonic masses. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 179, p. 91-97, 2014.

SANTOS, P. A. A. et al. (2015). Cryopreservation of the mangaba tree (*Hancornia speciosa* Gomes): a protocol for long-term storage. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 37, n. 3, p. 289-296.

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

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

TAKAGI, H. et al. Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of taro (*Colocasia esculenta* (L.) Schott) by vitrification. 1. Investigation of basic conditions of the vitrification procedure. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 16, p. 594–599, 1997.

UCHENDU, E. E.; REED, B. M. A comparative study of three cryopreservation protocols effective storage of in vitro-grown mint (*Mentha* SPP.). **Cryo Letters**, Lewes, v. 29, n. 3, p. 181-188, 2008.

VOLK, G. M. et al. Citrus cryopreservation: viability of diverse taxa and histological observations. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Nova Iorque, v. 128, p. 327-334, 2017.

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

VUJOVIĆ, T. et al. Cryopreservation of *Prunus* spp. using aluminium cryo-plates. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 195, p. 173–182, 2015.

VUJOVIĆ, T. et al. Droplet-vitrification of apical shoot tips of *Rubus fruticosus* L. and *Prunus cerasifera* Ehrh. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 130, n. 1, p. 222–228, 2011.

WATT, M. P., et al. Biotechnology developments in tree improvement programmes in commercial forestry in South Africa. **South African journal of science**, Pretória, v. 93, n.3, p. 100-102, 1997.

YAMAMOTO, S. et al. Development of a cryopreservation procedure using aluminum cryo-plates. **Cryo Letters**, Lewes, v. 32, n. 3, p. 256–265, 2011b.

ZHU, G. Y. et al. Change in sugar, sterol and fatty acid composition in banana meristems caused by sucrose-induced acclimation and its effects on cryopreservation. **Physiologia Plantarum**, Helsinque, v. 128, n. 1, p. 80–94, 2006.