



CAROLINE DE OLIVEIRA TIMOTEO

**EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE *Coffea arabica* L.
CRIOPRESERVADOS POR *ENCAPSULATION-
DEHYDRATION* E ACLIMATIZADOS POR HIDROPONIA**

**LAVRAS-MG
2022**

CAROLINE DE OLIVEIRA TIMOTEO

**EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE *Coffea arabica* L. CRIOPRESERVADOS POR
ENCAPSULATION-DEHYDRATION E ACLIMATIZADOS POR HIDROPONIA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fisiologia vegetal, para obtenção do título de Doutora.

Prof. Renato Paiva, PhD
Orientador

Prof^a. Dr^a Michele Valquíria dos Reis
Coorientadora

Dr. Diogo Pedrosa Corrêa da Silva
Coorientador

**LAVRAS-MG
2022**

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

Timoteo, Caroline de Oliveira.

Embriões zigóticos de *Coffea arabica* L. criopreservados por
encapsulation-dehydration e aclimatizados por hidroponia /
Caroline de Oliveira Timoteo. - 2022. 87 p. : il.

Orientador: Renato Paiva.

Coorientador: Michele Valquíria dos Reis, Diogo Pedrosa
Corrêa da Silva.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2022.
Bibliografia.

1. Conservação. 2. Cultivo *in vitro*. 3. Semi hidroponia. I.
Paiva, Renato. II. Reis, Michele Valquíria dos. III. Silva, Diogo
Pedrosa Corrêa da. IV. Título.

CAROLINE DE OLIVEIRA TIMOTEO

**EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE *Coffea arabica* L. CRIOPRESERVADOS POR
ENCAPSULATION-DEHYDRATION E ACLIMATIZADOS POR HIDROPONIA**

***Coffea arabica* L. ZYGOTIC EMBRYOS CRYOPRESERVED BY ENCAPSULATION-
DEHYDRATION AND ACCLIMATIZED BY HYDROPONICS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fisiologia vegetal, para obtenção do título de Doutora.

APROVADA em 18 de fevereiro de 2022.

Dra. Michele Valquíria dos Reis – UFLA

Dra. Débora de Oliveira Prudente – Centro de Tecnologia Canavieira – CTC

Dra. Raírys Cravo Herrera – UFPA

Dra. Sttela Dellyzete Veiga Franco da Rosa – Embrapa Café

Prof. Renato Paiva, PhD
Orientador

Profa. Dra. Michele Valquíria dos Reis
Coorientadora

Dr. Diogo Pedrosa Corrêa da Silva
Coorientador

**LAVRAS-MG
2022**

*À minha mãe Rosa, ao meu pai Sérgio e à minha irmã Bruna
pelo apoio e carinho em todas as etapas...*

Dedico

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Rosa e Sergio e a minha irmã Bruna, por acreditarem junto comigo nos meus sonhos e pelo incentivo e apoio em todas as etapas desse percurso.

À Universidade Federal de Lavras, especialmente ao Departamento de Biologia, Setor de Fisiologia Vegetal, pela oportunidade de realização do doutorado e por oferecer as instalações necessárias para realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de doutorado, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro.

Ao meu orientador, Professor Renato Paiva, por ter aceitado me orientar, pela confiança depositada em mim ao me proporcionar a oportunidade de realizar esse projeto e pelos ensinamentos e conselhos concedidos durante a pós-graduação.

A Michele Valquíria dos Reis e ao Diogo Pedrosa Corrêa da Silva que me auxiliaram na realização desse trabalho, pela confiança depositada em mim, pela paciência durante a execução dos experimentos e pelos ensinamentos oferecidos.

A todos os integrantes do Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, pela companhia de todos os dias, pela troca de experiências e por todos os trabalhos realizados juntos.

Aos professores do Setor de Fisiologia Vegetal pelos conhecimentos adquiridos no decorrer desses anos. E aos funcionários do Setor, pela convivência e pela disponibilidade em esclarecer dúvidas e fornecer materiais para execução dos experimentos, quando necessários.

Aos membros da banca, pela disponibilidade e pelas contribuições.

E a todos que, de alguma maneira, direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão desse trabalho, deixo meus sinceros agradecimentos.

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

BIOGRAFIA

CAROLINE DE OLIVEIRA TIMOTEO, filha de Sergio Pedro Timoteo e de Rosa Silvéria de Oliveira Filha, nasceu no dia 13 de novembro de 1993, na cidade de São Gotardo-MG. Ingressou no curso de Bacharelado em Ciências Biológicas na Universidade Federal de Viçosa *campus* Rio Paranaíba (UFV-CRP) em 2012, concluindo em 2016, quando apresentou o trabalho de conclusão de curso “Otimização do protocolo de germinação *in vitro*, aclimatização e embriogênese somática de *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.” com auxílio financeiro de bolsa de iniciação científica do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Em março de 2016, ingressou no curso de mestrado do Programa de Pós-graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal, da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras-MG, onde desenvolveu pesquisas na área de nanotecnologia aplicada ao cultivo *in vitro* de espécies frutíferas, sob a orientação do Professor Renato Paiva, concluindo em fevereiro de 2018. Em março do mesmo ano, ingressou no curso de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal, onde desenvolveu pesquisas na área de criopreservação de culturas de interesse comercial, sob a orientação do Professor Renato Paiva.

“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim” (Chico Xavier).

RESUMO

O café é uma das bebidas mais populares do mundo, compreendendo a base da economia de vários países tropicais, incluindo o Brasil. A produção cafeeira é baseada principalmente na espécie *Coffea arabica*, preferida pelos consumidores devido a qualidade da bebida. Dada a importância do café para a economia mundial, é indispensável que os recursos genéticos dessa cultura sejam conservados em longo prazo. Tendo em vista que o café arábica é propagado principalmente por sementes e que a reprodução ocorre predominantemente por autopolinização, as sementes ou eixos embrionários são ideais para conservação dos recursos genéticos dessa espécie. Nesse contexto o objetivo desse estudo foi estabelecer um protocolo para a criopreservação de embriões zigóticos de cultivares de *Coffea arabica*, (IAC 62 e IAC 144) por meio das técnicas de *encapsulation-dehydration* e *encapsulation-vitrification*. Para iniciar esse processo os embriões zigóticos foram extraídos das sementes e encapsulados por uma matriz de alginato de sódio e meio de cultivo. Na técnica de *encapsulation-dehydration*, após o pré-cultivo, os embriões zigóticos encapsulados foram desidratados e imersos imediatamente em nitrogênio líquido (-196 °C) ou inoculados em meio de cultivo. Para a técnica de *encapsulation-vitrification*, após o pré-cultivo, os embriões zigóticos encapsulados foram imersos na *Loading Solution* e posteriormente foram imersos em solução de *Plant vitrification solution 2* (PVS2) e imersos em nitrogênio líquido ou inoculados em meio de cultivo. Foram realizadas avaliações quanto ao comprimento das plântulas, peso e número de folhas, análises anatômicas e bioquímicas, quanto as atividades de enzimas do metabolismo antioxidante (SOD, POD, CAT e APX), quantificação de peróxido de hidrogênio, peroxidação lipídica e teor de prolina. Após a regeneração das plântulas formadas pelo desenvolvimento dos embriões zigóticos criopreservados foi realizada a aclimatização em sistema hidropônico com substrato. Os resultados indicaram que os embriões zigóticos foram capazes de sobreviver e regenerar após o processo de criopreservação quando desidratados a partir de 8 horas. As plântulas regeneradas de embriões zigóticos criopreservados apresentaram crescimento estatisticamente semelhante ao de plântulas cujos embriões zigóticos não foram criopreservados. As avaliações anatômicas demonstraram uma retração do volume das células do meristema fundamental em decorrência do processo de desidratação e as análises bioquímicas indicaram maior teor de prolina e atividade das enzimas SOD e POD. As plantas aclimatizadas originadas de embriões zigóticos que foram criopreservados atingiram as mesmas características fenotípicas de plantas cujos embriões não foram criopreservados. Em relação a técnica de *encapsulation-vitrification*, os embriões zigóticos não foram capazes de sobreviver ao processo de congelamento. Dessa forma conclui-se que é possível criopreservar embriões zigóticos de cultivares de café arábica por meio da técnica de *encapsulation-dehydration*, tendo em vista que o teor de umidade é fator chave para a sobrevivência dos explantes e que a aclimatização pode ser realizada por meio do sistema hidropônico com substrato.

Palavras-chaves: Conservação. Cultivo *in vitro*. Semi-hidroponia. Sistema antioxidante. Prolina.

ABSTRACT

Coffee is one of the most popular beverages in the world, comprising the basis of economy for several tropical countries, including Brazil. Coffee production is mainly based on *Coffea arabica* species, preferred by consumers due to the quality of the drink. Given the importance of coffee to the world economy, it is essential that genetic resources are conserved in the long term. Considering that arabica coffee is propagated mainly by seeds and reproduction occurs predominantly by self-pollination, seeds or embryonic axes are ideal for conserving the genetic resources. In this context, the objective of this study was to establish a protocol for the cryopreservation of zygotic embryos of cultivars of *Coffea arabica* (IAC 62 and IAC 144) through the techniques of encapsulation-dehydration and encapsulation-vitrification. To start this process, the zygotic embryos were extracted from the seeds and encapsulated in a sodium alginate matrix and culture medium. In the encapsulation-dehydration technique, after pre-culture, the encapsulated zygotic embryos were dehydrated and immediately immersed in liquid nitrogen (-196 °C) or inoculated in a culture medium. For the encapsulation-vitrification technique, after pre-culture, the encapsulated zygotic embryos were immersed in Loading Solution and subsequently immersed in Plant vitrification solution 2 (PVS2) and immersed in liquid nitrogen or inoculated in culture medium. Evaluations were carried out regarding seedling length, weight, and number of leaves, anatomical and biochemical analyzes regarding the activities of antioxidant metabolism enzymes (SOD, POD, CAT and APX), quantification of hydrogen peroxide, lipid peroxidation and proline content. After the regeneration of the seedlings formed by the development of cryopreserved zygotic embryos, acclimatization was performed in a hydroponic system with substrate. The results indicated that the zygotic embryos were able to survive and regenerate after the cryopreservation process when dehydrated after 8 hours. Seedlings regenerated from cryopreserved zygotic embryos showed statistically similar growth to seedlings whose zygotic embryos were not cryopreserved. The anatomical evaluations showed a retraction in the volume of the fundamental meristem cells because of the dehydration process and the biochemical analyzes indicated a higher content of proline and activity of SOD and POD enzymes. Acclimatized plants originated from zygotic embryos that were cryopreserved reached the same phenotypic characteristics of plants whose embryos were not cryopreserved. Regarding the encapsulation-vitrification technique, the zygotic embryos were not able to survive the freezing process. Thus, it is concluded that it is possible to cryopreserve zygotic embryos of arabica coffee cultivars through the encapsulation-dehydration technique, considering that the moisture content is a key factor for the survival of the explants and that the acclimatization can be carried out through of the hydroponic system with substrate.

Keywords: Conservation. *In vitro* cultivation. Semi-hydroponics. Antioxidant system. Proline.

SUMÁRIO

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| CAPÍTULO 1 | 12 |
| 1 INTRODUÇÃO GERAL | 13 |
| 2 REFERENCIAL TEÓRICO | 14 |
| 2.1 Importância da conservação de espécies de <i>Coffea</i> spp. | 14 |
| 2.2 Conservação do germoplasma vegetal..... | 16 |
| 2.3 Criopreservação..... | 17 |
| 2.3.1 <i>Encapsulation-dehydration</i> e <i>encapsulation-vitrification</i> | 17 |
| 2.3.2 Estresse oxidativo na criopreservação | 19 |
| 2.4 Aclimatização | 21 |
| REFERÊNCIAS | 23 |
| CAPÍTULO 2..... | 28 |
| EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE <i>Coffea arabica</i> L. CRIOPRESERVADOS POR ENCAPSULATION-DEHYDRATION E ENCAPSULATION-VITRIFICATION | 28 |
| 1 INTRODUÇÃO | 31 |
| 2 MATERIAL E MÉTODOS | 32 |
| 2.1 Desinfestação das sementes e excisão dos embriões zigóticos..... | 32 |
| 2.2 Criopreservação..... | 33 |
| 2.2.1 Encapsulamento..... | 33 |
| 2.2.2 <i>Encapsulation-dehydration</i> | 33 |
| 2.2.3 <i>Encapsulation-vitrification</i> | 35 |
| 2.2.4 Condições de cultivo | 36 |
| 2.3 Análise anatômica..... | 36 |
| 2.4 Determinação do conteúdo de peróxido de hidrogênio e malondialdeído..... | 37 |
| 2.5 Determinação da atividade de enzimas do metabolismo antioxidante | 38 |
| 2.6 Determinação do conteúdo de prolina | 39 |
| 2.7 Delineamento experimental | 39 |
| 3 RESULTADOS | 39 |
| 3.1 <i>Coffea arabica</i> L. cv. Catuaí amarelo (IAC 62) | 39 |
| 3.1.1 <i>Encapsulation-dehydration</i> | 39 |
| 3.1.1.1 Sobrevivência após descongelamento | 39 |
| 3.1.1.2 Desenvolvimento dos embriões zigóticos após descongelamento | 45 |
| 3.1.1.3 Análise bioquímica | 48 |
| 3.1.2 <i>Encapsulation-vitrification</i> | 50 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.2 <i>Coffea arabica</i> L. cv. Catuaí vermelho (IAC 144) | 50 |
| 3.2.1 <i>Encapsulation-dehydration</i> | 50 |
| 3.2.1.1 Sobrevivência após descongelamento | 50 |
| 3.2.1.2 Desenvolvimento dos embriões zigóticos após descongelamento | 53 |
| 3.2.2 <i>Encapsulation-vitrification</i> | 55 |
| 4 DISCUSSÃO | 56 |
| 5 CONCLUSÃO..... | 59 |
| REFERÊNCIAS | 60 |
| CAPÍTULO 3..... | 64 |
| ACLIMATIZAÇÃO EM SISTEMA HIDROPÔNICO DE PLÂNTULAS DE <i>Coffea arabica</i> L. ORIGINADAS DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS CRIOPRESERVADOS | 64 |
| 1 INTRODUÇÃO | 67 |
| 2 MATERIAL E MÉTODOS | 68 |
| 2.1 Material vegetal | 68 |
| 2.2 Substrato para aclimatização em sistema hidropônico..... | 68 |
| 2.3 Aclimatização de plântulas regeneradas de embriões zigóticos criopreservados..... | 70 |
| 2.4 Delineamento experimental | 70 |
| 3 RESULTADOS | 70 |
| 3.1 Substrato para aclimatização em sistema hidropônico..... | 70 |
| 3.2 Aclimatização de plântulas regeneradas de embriões zigóticos criopreservados..... | 73 |
| 3.2.1 <i>Coffea arabica</i> L. cv. Catuaí amarelo | 73 |
| 3.2.2 <i>Coffea arabica</i> L. cv. Catuaí vermelho | 76 |
| 4 DISCUSSÃO | 81 |
| 5 CONCLUSÃO..... | 84 |
| REFERÊNCIAS | 85 |

CAPÍTULO 1

Embriões zigóticos de *Coffea arabica* L. criopreservados por *encapsulation-dehydration* e aclimatizados por hidroponia

1 INTRODUÇÃO GERAL

O café tem um papel econômico de grande importância, pois apresenta-se como a segunda commodity mais comercializada globalmente, ficando atrás somente do petróleo (DAVIS et al., 2012). A produção global de café atingiu cerca de 164,8 milhões de sacas de 60 kg na safra de 2020/2021, sendo que o Brasil correspondeu pela produção de 48,81 milhões de sacas (CONAB, 2021). Dada a importância do café para a economia mundial, é indispensável que os recursos genéticos dessa cultura sejam conservados em longo prazo, tendo em vista que, as mudanças climáticas (variações na precipitação anual, temperatura média, aumento da concentração de CO₂ atmosférico) são sentidas cada vez mais na agricultura, o que pode afetar negativamente as colheitas agrícolas mundiais (RAZA et al., 2019), principalmente a cultura do café, cujas projeções demonstram que regiões consideradas ideais para o cultivo podem se tornar inadequadas devido as mudanças de temperatura e regime hídrico (PHAM et al., 2019; TAVARES et al., 2018).

O armazenamento em bancos de sementes *ex situ* é uma estratégia importante para a conservação de plantas, mas envolve a secagem do material (aproximadamente 15% de umidade relativa), seguido pelo processo de armazenamento a -20 °C, protocolo este que não é adequado para sementes recalcitrantes ou intermediárias (BREMAN et al., 2021). Para estas espécies protocolos de criopreservação vêm sendo amplamente utilizados para conservação de germoplasma (REED et al., 2017). A técnica de criopreservação é baseada no uso de temperaturas ultrabaixas, tipicamente fornecidas por nitrogênio líquido, -196 °C, permitindo o armazenamento em longo prazo de genótipos únicos (PENCE et al., 2020).

Diferentes abordagens podem ser utilizadas para a criopreservação de sementes recalcitrantes e intermediárias, pois este é um procedimento complexo dependente da capacidade das sementes de sobreviverem à dessecação e condições criogênicas (REED et al., 2017). Normalmente, essas sementes são maiores em tamanho para serem desidratadas rapidamente ou resfriadas de forma eficaz, dessa forma, em vez da semente completa, embriões zigóticos ou eixos embrionários excisados de suas sementes são frequentemente utilizados (WALTERS et al., 2013). No entanto, ainda existem grandes desafios em relação à eficiência e aplicabilidade dos protocolos de criopreservação para uma ampla gama de espécies com sementes recalcitrantes pois não existe um protocolo universal que possa ser usado para preservar as espécies vegetais de forma geral (PENCE et al., 2020). Dessa forma protocolos de criopreservação devem ser desenvolvidos e adaptados para cada espécie ou até mesmo para variedades diferentes de cultivares dentro da mesma espécie.

Nesse contexto, tendo em vista a importância das coleções criopreservadas para o futuro do melhoramento de plantas e restauração de ecossistemas e, considerando as mudanças ambientais previstas ou até mesmo o desenvolvimento de novas doenças que venham a dizimar populações inteiras de espécies vegetais, torna-se imprescindível o desenvolvimento de um protocolo eficiente para a criopreservação de café arábica, cuja produção é o carro chefe da economia de muitos países, inclusive o Brasil.

Além do protocolo de criopreservação também é importante demonstrar um método eficiente para aclimatizar as plântulas regeneradas *in vitro*. A etapa de transferência de plântulas do ambiente *in vitro* para o ambiente *ex vitro* é denominada de aclimatização, um processo importante para que as plantas possam adaptar-se a condições de cultivo não controladas sob a qual estarão sujeitas a estresses abióticos e bióticos (CHANDRA et al., 2010). Finalizada a etapa de aclimatização as plantas deverão ser capazes de sobreviver quando introduzidas em campo (CHANDRA et al., 2010). A aclimatização por meio de cultivo em hidroponia ou semi-hidroponia (hidroponia com substrato), tem gerado um melhor desenvolvimento das plântulas quando comparado ao cultivo convencional (TOYOSUMI et al., 2021; PUROHIT et al., 2021).

Dessa forma o objetivo do presente estudo foi estabelecer um protocolo para a criopreservação de embriões zigóticos de cultivares de *Coffea arabica*, por meio das técnicas de *encapsulation-dehydration* e *encapsulation-vitrification* e estender o uso da hidroponia com substrato para aclimatização de plântulas regeneradas *in vitro*, após a criopreservação.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Importância da conservação de espécies de *Coffea* spp.

O café é uma das bebidas mais populares do mundo sendo a segunda commodity mais comercializada globalmente (DAVIS et al., 2012), cuja produção dobrou nos últimos 30 anos, chegando a mais de 169 milhões de sacas (ICO, 2021). O Brasil responde por cerca de 36% da produção mundial, seguido pelo Vietnã (17%), Colômbia (8%) e Indonésia (6%) (ICO, 2021). Cerca de 70% da safra mundial é cultivada por pequenos produtores, menos de 10 ha, envolvendo, em âmbito internacional, cerca de 500 milhões de pessoas em seu manejo, desde o cultivo até a finalização do produto para consumo (DAMATTA et al., 2007).

Entre cerca de 100 espécies do gênero *Coffea* (DAVIS et al., 2006), apenas *C. arabica* L. (café arábica) e *C. canephora* Pierre ex A. Froehner (café robusta) são economicamente importantes em todo o mundo, ocupando cerca de 99% da produção mundial, com o café

arábica representando 64% do café produzido (DAMATTA et al., 2007). O *C. arabica* é preferido pelos consumidores devido ao seu baixo amargor, suas características aromáticas e seu baixo teor de cafeína, quando comparado com o *C. canephora* que apresenta um amargor mais forte (LÉCOLIER et al., 2009).

O acompanhamento da safra brasileira de café arábica, referente ao ano de 2021 correspondeu a mais de 1,7 milhão de hectares, atingindo cerca de 47,72 milhões de sacas beneficiadas no país (CONAB, 2021). O setor de cafeicultura abrange aproximadamente 300 mil produtores que estão distribuídos em aproximadamente 1900 municípios, compreendendo os estados de Minas Gerais, São Paulo, Espírito Santo, Bahia, Rondônia, Paraná, Rio de Janeiro, Goiás, Mato Grosso, Amazonas e Pará (MAPA, 2018). Em Minas Gerais concentra-se a maior área ocupada de café arábica, com mais de 1,28 milhão de hectares (CONAB, 2021).

Em referência a importância da produção de café no Brasil como fonte de receita para centenas de municípios, gerando mais de 8 milhões de empregos, o país investe significativamente em pesquisas que envolvem desde o melhoramento genético à sustentabilidade econômica e ambiental (MAPA, 2018). Dentre essas pesquisas, nos últimos anos tem surgido estudos que avaliam os impactos das mudanças climáticas sobre a produtividade do café arábica no Brasil, cujas projeções demonstram que regiões consideradas ideais para o cultivo do café podem se tornar inadequadas para a produção agrícola devido ao aumento da temperatura média e déficit hídrico associados ao aumento da concentração de CO₂ (PHAM et al., 2019; TAVARES et al., 2018).

Nesse contexto, acredita-se que a produção de café arábica pode ser substancialmente afetada pelas mudanças climáticas tendo em vista que seu cultivo é determinado pelas condições ambientais que influenciam o crescimento vegetativo, a fase reprodutiva, o desenvolvimento e amadurecimento dos frutos, sendo este sensível a ocorrência de geadas e temperaturas elevadas (DAMATTA et al., 2007). Além das mudanças nas condições climáticas, as alterações no clima podem modificar a incidência e a distribuição de pragas do café, o que também afetaria diretamente a produção agrícola (RHINEY et al., 2021; MAGRACH; GHAZOUL, 2015).

Diante do exposto nota-se a necessidade de conservar em longo prazo o material genético do café para que este material possa ser utilizado em programas de melhoramento genético para fornecer cultivares que sejam resistentes ao aumento de temperatura, déficit hídrico, pragas e doenças, sem prejuízos a qualidade da bebida e ao rendimento produtivo.

2.2 Conservação do germoplasma vegetal

Conservação do germoplasma vegetal pode ser realizada *in situ* ou *ex situ*. No primeiro caso, as espécies são mantidas em seu ambiente natural, como reservas naturais ou corredores de conservação, no entanto, danos ambientais causados por ação antropogênica ou por desastres naturais, incluindo fatores decorrentes de mudanças climáticas podem acarretar perdas da biodiversidade (LI; PRITCHARD, 2009). Nesse contexto estratégias *in situ* por si só não são suficientes para garantir a conservação do patrimônio genético vegetal. Portanto, é essencial integrar programas de conservação da biodiversidade vegetal *in situ* com as estratégias *ex situ* que preservam os materiais biológicos em ambientes artificiais, com a possibilidade de reintroduzi-los em seus habitats naturais (PRITCHARD et al., 2012).

O banco de sementes corresponde a uma estratégia *ex situ*, mais amplamente empregada por ser um método simples, econômico e eficiente de conservação de germoplasma vegetal a longo prazo, no entanto, a prática atual que compreende no armazenamento de sementes, sob baixa umidade e temperatura (LI; PRITCHARD, 2009), somente pode ser aplicada à espécies que apresentam sementes ortodoxas, tolerantes a dessecação (POTTER et al., 2017), não sendo recomendado para as espécies ortodoxas que apresentam vida curta (<10 anos) e para aquelas que apresentam sementes recalcitrantes, sensíveis a dessecação, ou intermediárias, relativamente tolerantes à dessecação, pois estas não são tolerantes a secagem, e portanto não sobreviveriam ao congelamento (WYSE; DICKIE; WILLIS, 2018), o que inviabilizaria seu armazenamento em bancos de sementes. A conservação *ex situ* por meio do banco de sementes também não poderia ser aplicada em espécies que produzem poucas ou nenhuma semente (propagação vegetativa) ou para espécies cuja coleta de sementes é inviável (CAVENDER et al., 2015; GONZÁLEZ-BENITO; RAMÍREZ; ARANDA, 2004).

Para estas espécies, cujo banco de sementes não é efetivo como método para conservação, outras metodologias de conservação *ex situ* são necessárias, incluindo técnicas de criopreservação em nitrogênio líquido e métodos de cultivo *in vitro* associados (WYSE; DICKIE; WILLIS, 2018). A criopreservação é uma técnica que possui grande potencial para conservação de recursos genéticos por longos períodos, incluindo as espécies que apresentam sementes recalcitrantes, intermediárias e ortodoxas de vida curta (LI; PRITCHARD, 2009).

2.3 Criopreservação

A criopreservação é um tipo de conservação *ex situ* de longo prazo, que se refere ao armazenamento de material biológico em temperatura ultrabaixa, geralmente a de nitrogênio líquido (-196 °C), nessa temperatura todas as divisões celulares e processos metabólicos são interrompidos, dessa forma as amostras biológicas podem ser armazenadas sem alteração ou modificação do material genético, por um período de tempo teoricamente ilimitado, além disso, os materiais são armazenados em pequenos recipientes, sem risco de contaminações e a manutenção é mínima (ENGELMANN, 2004). Diferentes tipos de células, tecidos e órgãos vegetais podem ser criopreservados (sementes recalcitrantes, suspensões celulares, calos, ápices, gemas e embriões zigóticos ou somáticos) sem perda de sua viabilidade (WANG et al., 2021).

Para que um protocolo de criopreservação seja eficiente, as células das plantas que foram congeladas devem ser capazes de se recuperar de temperaturas ultrabaixas sem lesões (COELHO; GONÇALVES; ROMANO, 2020). A principal causa de lesões celulares é a formação de cristais de gelo, causados pela transição do estado líquido da água para o estado sólido, durante o processo de resfriamento (WESLEY-SMITH et al., 2013). Os materiais vegetais que podem ser criopreservados contêm grandes quantidades de água livre nas células e são, portanto, extremamente sensíveis a danos por congelamento, uma vez que, não apresentam características de tolerância ao congelamento (ENGELMANN, 2011). O gelo pode se formar tanto no meio extracelular, ao redor das células, quanto intracelular causando uma série de eventos prejudiciais, incluindo alterações na ultraestrutura das membranas celulares e ruptura de organelas (CHANG; ZHAO, 2021).

Para evitar a formação de cristais de gelo, as células devem ser desidratadas artificialmente, antes do resfriamento em nitrogênio líquido, para isso existem diferentes técnicas de criopreservação que empregam mecanismos físicos distintos que protegem os materiais vegetais dos danos causados pela cristalização da água (ENGELMANN, 2011).

2.3.1 *Encapsulation-dehydration e encapsulation-vitrification*

As técnicas de *encapsulation-dehydration* e *encapsulation-vitrification* são técnicas convencionais de criopreservação usadas com sucesso na conservação de uma ampla gama de espécies de plantas (CIRINGER et al., 2018).

A técnica de encapsulamento é baseada na tecnologia de semente sintética que consiste no encapsulamento de embriões somáticos, ápices de brotos, segmentos nodais, gemas axilares, calos embriogênicos, entre outros tipos de explantes, em uma matriz composta por substâncias, como o alginato de sódio e cloreto de cálcio (SHARMA; SHAHZAD; DA SILVA, 2013). Esses explantes devem possuir a capacidade de se converter em uma planta em condições *in vitro* e/ou condições *ex vitro* e devem reter esse potencial mesmo após o armazenamento (ARA; JAISWAL; JAISWAL, 2000).

A criopreservação por meio de *encapsulation-dehydration* constitui-se então na exposição dos explantes a altas concentrações de sacarose e na dessecação desse material antes da imersão em nitrogênio líquido, esse processo permite que os explantes sejam desidratados a baixos teores de umidade removendo a maior parte ou toda a água disponível nas células, dessa forma a cristalização do gelo intracelular, que poderia ser formado durante o congelamento do material, é evitada e o explante congelado é mantido intacto após o reaquecimento, o que resulta em altas taxas de sobrevivência dos explantes (ENGELMANN et al., 2008).

A técnica de *encapsulation-dehydration* compreende as seguintes etapas: pré-tratamento dos explantes em soluções com alta concentração de sacarose, reguladores de crescimento, antioxidantes (GONZÁLEZ-BENITO et al., 2016) ou tratamentos de aclimação ao frio, onde os explantes são cultivados em condições de baixas temperaturas (LYNCH et al., 2014), encapsulamento dos explantes em uma matriz composta ou não por meio de cultura, suplementado por alginato de sódio seguido, por pré-cultivo em meio de cultivo com alta concentração de sacarose (FENG et al., 2013), desidratação em capela de fluxo laminar (PADRÒ et al., 2012), congelamento e armazenamento em nitrogênio líquido, descongelamento e regeneração dos explantes (KULUS, 2020).

Em referência ao processo de vitrificação, este constitui-se na solidificação de um líquido (requer a presença de altas concentrações de crioprotetores) para uma fase amorfa ou de vidro, quando submetido a temperaturas muito baixas, sem sofrer cristalização (FAHY et al., 1984), evitando assim a degradação das células ocasionada pelo congelamento em procedimentos de criopreservação. Diferentes soluções crioprotetoras para o processo de vitrificação foram desenvolvidas ao longo do tempo. No entanto, a solução de vitrificação mais comumente utilizada é designada de PVS2 (*plant vitrification solution*) que contém 30% (p/v) de glicerol, 15% (p/v) de etilenoglicol, 15% (p/v) de DMSO em meio de cultura suplementado por 0,4 M sacarose (SAKAI; KOBAYASHI; OIYAMA, 1990).

Em alguns protocolos de vitrificação é realizado um pré-tratamento das amostras, pois a exposição dos explantes diretamente à solução de vitrificação pode ser altamente tóxico, dessa

forma as amostras a serem criopreservadas podem ser tratadas com uma solução crioprotetora constituída por uma concentração intermediária, a fim de prepará-las para exposição à solução de PVS2 (SAKAI; ENGELMANN, 2007). Essa solução denominada de LS (*loading solution*) é composta por glicerol 2,0 M (18%) e sacarose 0,4 M (14%) diluídos em meio de cultura (NISHIZAWA et al., 1992). Os procedimentos de congelamento e reaquecimento das amostras devem ser realizados rapidamente para evitar eventos de desvitrificação e recristalização prejudiciais as células, para o resfriamento as amostras são imersas diretamente em nitrogênio líquido e para o descongelamento as amostras podem ser imersas em banho maria, 37- 40 °C (SAKAI; ENGELMANN, 2007). Após o reaquecimento os explantes podem ser tratados por uma solução de RS (*recovery solution*), constituída por 1,2 M sacarose dissolvida em meio de cultura líquido (SAKAI; KOBAYASHI; OIYAMA, 1990).

Na técnica de *encapsulation-vitrification*, combina-se o método de encapsulamento com os métodos da vitrificação, em que os explantes são primeiramente encapsulados e posteriormente segue-se os procedimentos da técnica de vitrificação (SAKAI; ENGELMANN, 2007).

Estudos aplicando o método de vitrificação para criopreservação de embriões zigóticos de cultivares de café arábica foram relatados na literatura (VALDÉS et al., 2021; FREITAS et al., 2016), no entanto, até o momento em que é apresentando esse estudo ainda não foram descritos, estudos que utilizem os métodos de *encapsulation-dehydration* ou *encapsulation-vitrification* para a criopreservação de embriões zigóticos das cultivares de café arábica catuaí amarelo e catuaí vermelho. Dessa forma, como a criopreservação por encapsulamento é uma técnica validada e de uso rotineiro em criobancos pois permite o encapsulamento de diferentes tipos de explantes, incluindo diversos grupos taxonômicos, como algas, microorganismos, fungos, protistas, incluindo células animais, se mostrando eficaz para o armazenamento de organismos difíceis de criopreservar por meio de protocolos tradicionais (BENSON et al., 2018). As técnicas que empregam o encapsulamento por meio do alginato podem ser consideradas de grande relevância para a criopreservação de café, considerando a importância da conservação da cultura cafeeira para a economia mundial.

2.3.2 Estresse oxidativo na criopreservação

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são produzidas continuamente pelas células vegetais devido ao seu metabolismo aeróbio, sendo o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o superóxido (O_2^-), o radical hidroxila (OH^-) e o oxigênio singleto, os tipos de EROs mais comuns

encontradas nas células das plantas, produzidas como subprodutos de várias vias metabólicas (MITTLER et al., 2011). As EROs são produzidas em mitocôndrias, cloroplastos e peroxissomos e quando em excesso podem causar danos oxidativos às proteínas, DNA e lipídios (APEL; HIRT, 2004). Em razão do potencial citotóxico, as células vegetais apresentam mecanismos de eliminação de EROs, por meio de compostos enzimáticos e não enzimáticos (APEL; HIRT, 2004).

Os mecanismos de eliminação não enzimática de EROs incluem as moléculas de ascorbato, glutathione (GSH) e prolina (KAZEMI-SHAHANDASHTI; MAALI-AMIRI, 2018). Os enzimáticos incluem superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX), glutathione peroxidase (GPX) e catalase (CAT) (APEL; HIRT, 2004).

A prolina é um aminoácido essencial para o metabolismo primário, sua síntese ocorre a partir do glutamato, que é reduzido a glutamato-semialdeído (GSA) pela enzima pirrolina-5-carboxilato sintetase (P5CS), e convertido espontaneamente em pirrolina-5-carboxilato (P5C), a P5C redutase (P5CR) reduz ainda mais o intermediário P5C a prolina (MEENA et al., 2019). Tem sido relatado que a prolina atua na regulação do transporte de EROs, inibindo o estresse oxidativo em plantas, no equilíbrio osmótico ou na pressão de turgor celular e na estabilização de membranas celulares, evitando o vazamento de eletrólitos (HAYAT et al., 2012).

Em relação ao metabolismo enzimático, as SODs agem como a primeira linha de defesa contra EROs, promovendo a dismutação do superóxido em H_2O_2 , a APX, GPX, e CAT convertem H_2O_2 em H_2O . A desintoxicação de H_2O_2 em H_2O pela APX ocorre pela oxidação de ascorbato em MDA, que pode ser regenerado por MDA redutase (MDAR) usando NAD(P)H como equivalentes redutores (FOYER; SHIGEOKA, 2011). O MDA é convertido espontaneamente em AsA e desidroascorbato, mas, também pode ser reduzido a ascorbato pela ação da MDAR, dependente de NAD(P)H (FOYER; SHIGEOKA, 2011). A regeneração do ascorbato é mediada pela desidroascorbato redutase (DHAR) conduzida pela oxidação de GSH a GSSG, a glutathione redutase (GR) promove a regeneração de GSH a partir de GSSG usando NAD(P)H como agente redutor (APEL; HIRT, 2004). Como o APX, a GPX converte H_2O_2 em H_2O , usando GSH como um agente redutor, finalizando com a regeneração de GSH de GSSG por GR (APEL; HIRT, 2004).

O equilíbrio entre a produção e eliminação de EROs muitas vezes pode ser perturbado por uma série de fatores ambientais adversos, como como seca, salinidade, inundações, altas e baixas temperaturas, fazendo com que os níveis intracelulares dessas moléculas aumentem rapidamente, esse rápido aumento na concentração de EROs é denominado de “estresse oxidativo” (GILL; TUTEJA, 2010). A exposição de plantas a baixas temperaturas pode causar

ruptura de organelas, desidratação de células e tecidos, mudanças na fluidez da membrana celular, produção de espécies reativas de oxigênio, EROs, e o potencial de oxidação resultantes da produção dessas moléculas (KAZEMI-SHAHANDASHTI; MAALI-AMIRI, 2018). Apesar da criopreservação ser uma alternativa para a conservação de recursos genéticos vegetais, um dos problemas que precisam ser contornados para o estabelecimento dos protocolos consiste em evitar o estresse oxidativo, induzido por EROs, muitas vezes observado durante a execução das técnicas de criopreservação que impede a regeneração dos explantes (REN; WANG; WANG, 2021).

A criopreservação de plantas requer várias etapas, como o estabelecimento de culturas para retirada de explantes, excisão desses explantes, pré-cultivo, osmoproteção e crioproteção, desidratação, ciclo de congelamento-descongelamento e pós-cultivo, que podem induzir a geração de EROs (REN; WANG; WANG, 2021). Para manter o equilíbrio do metabolismo interno de geração de EROs tem-se observado um aumento das atividades dos antioxidantes intimamente relacionadas ao sucesso da criopreservação (REN et al., 2021). Nesse contexto é importante entender os mecanismos pelos quais os explantes são capazes de sobreviver e regenerar após os processos de criopreservação a fim de aplicar esses métodos rotineiramente em criobancos para conservação de recursos genéticos de diversas espécies.

2.4 Aclimatização

A última etapa após a regeneração dos explantes *in vitro* consiste na fase de aclimatização. Geralmente as plantas cultivadas *in vitro* apresentam diferenças em relação as plantas cultivadas em campo, os estômatos não são funcionais, o sistema radicular é pouco desenvolvido, a cutícula é fina e delgada e os estômatos apresentam alterações quanto a forma e estrutura (CHANDRA et al., 2010). Devido a essas características a transferência para o ambiente *ex vitro* usualmente é realizada de forma a garantir condições ótimas para o crescimento e sobrevivência das plântulas (SILVA et al., 2017). Os métodos usuais de aclimatização utilizam diferentes tipos de recipientes preenchidos com diferentes tipos de substratos, bem como áreas de cultivo artificiais (estufas ou salas de crescimento) em que as condições de umidade do ar são mantidas em níveis mais elevados para evitar a desidrataação das plântulas (CLAPA; FIRA; JOSHEE, 2013). No entanto, esses métodos vêm sendo modificados a fim de facilitar o processo de aclimatização e deixar as plantas mais rustificadas quando transferidas para o campo. Uma alternativa consiste no sistema de cultivo em hidroponia.

Hidroponia é uma técnica de cultivo de plantas em soluções nutritivas com ou sem o uso de um meio inerte (cascalho, vermiculita, lã de rocha, turfa, serragem, pó ou fibra de coco) para fornecer suporte mecânico (SHARMA et al., 2018). A maioria dos sistemas hidropônicos opera automaticamente para controlar a quantidade de água, nutrientes e fotoperíodo com base nas requisições nutricionais das diferentes espécies vegetais (KHAN; PUROHIT; VADSARIA, 2020).

Nos últimos anos, a técnica de cultivo em hidroponia está se tornando popular por ser um método limpo e relativamente fácil de ser executado, onde as chances de doenças transmitidas pelo solo, é mínima ou nula, o que reduz ou elimina o uso de pesticidas (SHARMA et al., 2018). Além disso, as plantas requerem menos tempo de crescimento em comparação com a cultura cultivada em campo e o crescimento da planta é mais rápido, pois os nutrientes estão prontamente disponíveis à absorção pelas raízes (SHARMA et al., 2018). Outras vantagens do cultivo em hidroponia consistem na possibilidade de produzir durante o ano inteiro (não há influência de mudanças climáticas) e economia de água, pois a irrigação não é necessária e maiores rendimentos podem ser obtidos, uma vez que o número de plantas por unidade é maior em comparação com a agricultura convencional (KHAN; PUROHIT; VADSARIA, 2020).

Recentemente o cultivo em sistema hidropônico tem sido usado com sucesso para aclimatização de plantas cultivadas *in vitro*. Em um estudo realizado com plântulas micropropagadas de banana foi observado que as plântulas aclimatizadas em sistema hidropônico apresentaram crescimento mais rápido tanto da parte aérea quanto do sistema radicular quando comparadas as plântulas aclimatizadas em sistema convencional, além disso o tempo para transplante foi reduzido em 12 dias e obteve-se um aumento no número de mudas produzidas por metro quadrado, devido a eficiência do uso do espaço propiciado pelo cultivo em hidroponia, e, redução nos custos para produção das mudas (TOYOSUMI et al., 2021).

Diante dessas vantagens o cultivo em sistema hidropônico foi escolhido para aclimatização das plântulas oriundas da criopreservação de embriões zigóticos de *Coffea arabica*, tendo em vista que esse sistema foi utilizado para o crescimento de mudas de café arábica propiciando um melhor desenvolvimento e qualidade das mudas quando comparado ao sistema convencional de cultivo em viveiro (LIMA et al., 2021).

REFERÊNCIAS

- APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, p. 373-399, 2004.
- ARA, H.; JAISWAL, U.; JAISWAL, V. S. Synthetic seed: Prospects and limitations. **Current Science**, v. 78, n. 12, p. 1438-1444, 2000.
- BENSON, E. E.; HARDING, K.; RYAN, M.; PETRENKO, A.; PETRENKO, Y.; FULLER, B. Alginate encapsulation to enhance biopreservation scope and success: A multidisciplinary review of current ideas and applications in cryopreservation and non-freezing storage. **Cryoletters**, v. 39, n. 1, p. 14-38, 2018.
- BREMAN, E.; BALLESTEROS, D.; CASTILLO-LORENZO, E.; COCKEL, C.; DICKIE, J.; FARUK, A.; O'DONNELL, K.; OFFORD, C. A.; PIRONON, S.; SHARROCK, S.; ULIAN, T. Plant diversity conservation challenges and prospects—The perspective of botanic gardens and the millennium seed bank. **Plants**, v. 10, n. 11, p. 2371, 2021.
- CAVENDER, N.; WESTWOOD, M.; BECHTOLDT, C.; DONNELLY, G.; OLDFIELD, S.; GARDNER, M.; RAE, D.; MCNAMARA, W. Strengthening the conservation value of *ex situ* tree collections. **Oryx**, v. 49, n. 3, p. 416-424, 2015.
- CIRINGER, T.; MARTÍN, C.; ŠAJNA, N.; KALIGARIČ, M.; AMBROŽIČ-DOLINŠEK J. Cryopreservation of an endangered *Hladnikia pastinacifolia* Rchb. by shoot tip encapsulation-dehydration and encapsulation-vitrification. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 54, p. 565-575, 2018.
- CHANDRA, S.; BANDOPADHYAY, R.; KUMAR, V.; CHANDRA, R. Acclimatization of tissue cultured plantlets: From laboratory to land. **Biotechnology Letters**, v. 32, p. 1199-1205, 2010.
- CHANG, T.; ZHAO, G. Ice inhibition for cryopreservation: Materials, strategies, and challenges. **Advanced Science**, v. 8, n. 2002425, p. 1-34, 2021.
- CLAPA, D.; FIRA, A.; JOSHEE, N. An efficient *ex vitro* rooting and acclimatization method for horticultural plants using float hydroculture. **Hortscience**, v. 48, n. 9, p. 1159-1167, 2013.
- COELHO, N.; GONÇALVES, S.; ROMANO, A. Endemic plant species conservation: Biotechnological approaches. **Plants**, v. 9, n. 3, p. 345, 2020.
- CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento (2021). **Acompanhamento da safra brasileira de café**. Brasília, v. 8 – Safra 2021, n 4 – Quarto levantamento, p. 1-55. Disponível em: < <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cafe> > Acessado em: Dezembro de 2021.
- DAMATTA, F. M.; RONCHI, C. P.; MAESTRI, M.; BARROS, R. S. Ecophysiology of coffee growth and production. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 9, n. 4, p. 485-510, 2007.

- DAVIS, A. P.; GOLE, T. W.; BAENA, S.; MOAT, J. The impact of climate change on indigenous arabica coffee (*Coffea arabica*): Predicting future trends and identifying priorities. **PloS One**, v. 7, n. 11, p. e47981, 2012.
- DAVIS, A. P.; GOVAERTS, R.; BRIDSON, D. M.; STOFFELEN, P. An annotated taxonomic conspectus of the genus *Coffea* (Rubiaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 152, n. 4, p. 465–512, 2006.
- EIRA, M. T.; SILVA, E. A.; CASTRO, R. D. de; DUSSERT, S.; WALTERS, C.; BEWLEY, J. D.; HILHORST, H. W. Coffee seed physiology. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 18, n. 1, p. 149-163, 2006.
- ENGELMANN, F. Plant cryopreservation: Progress and prospects. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 40, n. 5, p. 427-433, 2004.
- ENGELMANN, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 47, n. 1, p. 5-16, 2011.
- ENGELMANN, F.; ARNAO, M. T. G.; WU, Y.; ESCOBAR, R. Development of encapsulation dehydration. In: REED B. M. (eds). **Plant Cryopreservation: A Practical Guide**. Springer, New York, 2008. p 59-75.
- FAHY, G M.; MACFARLANE, D. R.; ANGELL, C. A.; MERYMAN, H. T. Vitrification as an approach to cryopreservation. **Cryobiology**, v. 21, n. 4, p. 407-426, 1984.
- FENG, C. H.; CUI, Z. H.; LI, B. Q.; CHEN, L.; MA, Y. L.; ZHAO, Y. H.; WANG, Q. C. Duration of sucrose preculture is critical for shoot regrowth of *in vitro*-grown apple shoot-tips cryopreserved by encapsulation-dehydration. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 112, n. 3, p. 369-378, 2013.
- FOYER, C. H.; SHIGEOKA, S. Understanding oxidative stress and antioxidant functions to enhance photosynthesis. **Plant Physiology**, v. 155, n. 1, p. 93-100, 2011.
- FREITAS, R. T.; PAIVA, R.; SALES, T. S.; SILVA, D. P. C.; REIS, M. V.; SOUZA, A. C.; ROSA, S. D. V. F. Cryopreservation of *Coffea arabica* L. zygotic embryos by vitrification. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, v. 44, n. 2, p. 445-451, 2016.
- GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, n. 12, p. 909-930, 2010.
- GONZÁLEZ-BENITO, M. E.; KREMER, C.; IBÁÑEZ, M. A.; MARTÍN, C. Effect of antioxidants on the genetic stability of cryopreserved mint shoot tips by encapsulation–dehydration. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 127, n. 2, p. 359-368, 2016.
- HAYAT, S.; HAYAT, Q.; ALYEMENI, M. N.; WANI, A. S.; PICHTEL, J.; AHMAD, A. Role of proline under changing environments: A review. **Plant Signaling & Behavior**, v. 7, n. 11, p. 1456-1466, 2012.

- ICO – International Coffee Organization (2021). **Historical Data on the Global Coffee Trade**. Disponível em: < https://www.ico.org/new_historical.asp> Acessado em: Dezembro de 2021.
- KAZEMI-SHAHANDASHTI, S. S.; MAALI-AMIRI, R. Global insights of protein responses to cold stress in plants: Signaling, defence, and degradation. **Journal of Plant Physiology**, v. 226, p. 123-135, 2018.
- KHAN, S.; PUROHIT, A.; VADSARIA, N. Hydroponics: Current and future state of the art in farming. **Journal of Plant Nutrition**, v. 44, n. 10, p. 1515-1538, 2020.
- KULUS, D. Cryopreservation of bleeding heart (*Lamprocapnos spectabilis* (L.) Fukuhara) shoot tips using encapsulation-dehydration. **CryoLetters**, v. 41, n. 2, p. 75-85, 2020.
- LÉCOLIER, A.; BESSE, P.; CHARRIER, A.; TCHAKALOFF, T. N.; NOIROT, M. Unraveling the origin of *Coffea arabica* “Bourbon pointu” from la Réunion: A historical and scientific perspective. **Euphytica**, v. 168, n. 1, p. 1-10, 2009.
- LI, D. Z.; PRITCHARD, H. W. The science and economics of *ex situ* plant conservation. **Trends in Plant Science**, v. 14, n. 11, p.614-621, 2009.
- LIMA, A. E. D.; GUIMARÃES, R. J.; CUNHA, S. H. B. D.; CASTRO, E. D. M.; CARVALHO, A. M. D.; FARIA, M. M. L. Seedling production of *Coffea arabica* from different cultivars in a modified hydroponic system and nursery using different containers. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 45, 2021.
- LYNCH, P. T.; SIDDIKA, A.; MEHRA, A.; BENELLI, C.; LAMBARDI, M. Cryopreservation of quince (*Cydonia oblonga* mill.). **CryoLetters**, v. 35, n. 3, p. 188-196, 2014.
- MAGRACH, A.; GHAZOUL, J. Climate and pest-driven geographic shifts in global coffee production: Implications for forest cover, biodiversity and carbon storage. **PLoS ONE**, v. 10, n. 7, p. e0133071, 2015.
- MEENA, M.; DIVYANSHU, K.; KUMAR, S.; SWAPNIL, P.; ZEHRRA, A.; SHUKLA, V.; YADAV, M.; UPADHYAY, R. S. Regulation of L-proline biosynthesis, signal transduction, transport, accumulation and its vital role in plants during variable environmental conditions. **Heliyon**, v. 5, n. 12, p. e02952, 2019.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). **Café no Brasil**. 2018. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/politica-agricola/cafe/cafeicultura-brasileira>. Acessado em: Novembro de 2021.
- MITTLER, R.; VANDERAUWERA, S.; SUZUKI, N.; MILLER, G. A. D.; TOGNETTI, V. B.; VANDEPOELE, K.; GOLLERY, M.; SHULAEV, V.; VAN BREUSEGEM, F. ROS signaling: The new wave? **Trends in Plant Science**, v. 16, n. 6, p. 300-309, 2011.
- NISHIZAWA, S. Cryopreservation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) embryogenic suspension cells and subsequent plant regeneration by a simple freezing method. **CryoLetters**, v. 13, p. 379-388, 1992.

- PADRÒ, M.D.A.; FRATTARELLI, A.; SGUEGLIA, A.; CONDELLO, E.; DAMIANO, C.; CABONI, E. Cryopreservation of white mulberry (*Morus alba* L.) by encapsulation-dehydration and vitrification. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 108, n. 1, p. 167-172, 2012.
- PENCE, V. C.; BALLESTEROS, D.; WALTERS, C.; REED, B. M.; PHILPOTT, M.; DIXON, K. W.; PRITCHARD, H. W.; CULLEY, T. M.; VANHOVEA, A. C. Cryobiotechnologies: Tools for expanding long-term *ex situ* conservation to all plant species. **Biological Conservation**, v. 250, p. 108736, 2020.
- PHAM, Y.; REARDON-SMITH, K.; MUSHTAQ, S.; COCKFIELD, G. The impact of climate change and variability on coffee production: A systematic review. **Climatic Change**, v. 156, n. 4, p. 609-630, 2019
- POTTER, K. M.; JETTON, R. M.; BOWER, A.; JACOBS, D. F.; MAN, G.; HIPKINS, V. D.; WESTWOOD, M. Banking on the future: Progress, challenges and opportunities for the genetic conservation of forest trees. **New Forests**, v. 48, p. 153-180, 2017.
- PRITCHARD, D. J.; FA, J. E.; OLDFIELD, S.; HARROP, S. R. Bring the captive closer to the wild: Redefining the role of *ex situ* conservation. **Oryx**, v. 46, n. 1, p. 18-23, 2012.
- PUROHIT, S.; RAWAT, J. M.; PATHAK, V. K.; SINGH, D. K.; RAWAT, B. A hydroponic-based efficient hardening protocol for *in vitro* raised commercial kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 57, n. 3, p. 541-550, 2021.
- RAZA, A.; RAZZAQ, A.; MEHMOOD, S. S.; ZOU, X.; ZHANG, X.; LV, Y.; XU, J. Impact of climate change on crops adaptation and strategies to tackle its outcome: A review. **Plants**, v. 8, n. 2, p. 34, 2019.
- REED, B.M. Plant cryopreservation: A continuing requirement for food and ecosystem security. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 53, p. 285-288, 2017.
- REN, L.; WANG, M-R.; WANG, Q-C. ROS-induced oxidative stress in plant cryopreservation: Occurrence and alleviation. **Planta**, v. 254, n. 6, p. 1-18, 2021.
- RHINEY, K.; GUIDO, Z.; KNUDSON, C.; AVELINO, J.; BACON, C. M.; LECLERC, G.; AIME, M. C.; BEBBER, D. P. Epidemics and the future of coffee production. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 118, n. 27, p. e2023212118, 2021.
- SAKAI, A.; ENGELMANN, F. Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: A review. **CryoLetters**, v. 28, n. 3, p. 151-172, 2007.
- SAKAI, A.; KOBAYASHI, S.; OIYAMA, I. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. **Plant Cell Reports**, v. 9, p. 30-33, 1990.
- SHARMA, N.; ACHARYA, S.; KUMAR, K.; SINGH, N.; CHAURASIA, O. P. Hydroponics as an advanced technique for vegetable production: An overview. **Journal of Soil and Water Conservation**, v. 17, n. 4, p. 364-371, 2018.

SHARMA, S.; SHAHZAD, A.; SILVA, J. A. T. Synseed technology—A complete synthesis. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 2, p. 186-207, 2013.

SILVA, J. A. T.; HOSSAIN, M. M.; SHARMA, M.; DOBRÁNSZKI, J.; CARDOSO, J.C.; SONGJUN, Z. Acclimatization of *in vitro* derived *Dendrobium*. **Horticultural Plant Journal**, v. 3, n. 3, p. 110-124, 2017.

TAVARES, P. S.; GIAROLLA, A.; CHOU, S. C.; SILVA, A. J. P.; LYRA, A. A. Climate change impact on the potential yield of Arabica coffee in southeast Brazil. **Regional Environmental Change**, v. 18, n. 3, p. 873-883, 2018.

TOYOSUMI, I. D. S.; SILVA, T. S. M. D.; MELO, D. M.; AZEVEDO, A. D. D.; SOARES, T. M.; COELHO, M. A. Optimization of banana plantlets acclimatization by hydroponic cultivation. **Scientia Agricola**, v. 78, p. e20200165, 2021.

VALDÉS, Y. C.; SHUKLA, M. R.; VEGA, M. E. G.; SAXENA, P. K. Improved conservation of coffee (*Coffea arabica* L.) germplasm via micropropagation and cryopreservation. **Agronomy**, v. 11, n. 9, p. 1861, 2021.

VAN DER VOSSEN, H.; BERTRAND, B.; CHARRIER, A. Next generation variety development for sustainable production of arabica coffee (*Coffea arabica* L.): A review. **Euphytica**, v. 204, p. 243-256, 2015.

WALTERS, C.; BERJAK, P.; PAMMENTER, N.; KENNEDY, K.; RAVEN, P. Preservation of recalcitrant seeds. **Science**, v. 339, n. 6122, p. 915-916, 2013.

WANG, M. R.; LAMBARDI, M.; ENGELMANN, F.; PATHIRANA, R.; PANIS, B.; VOLK, G. M.; WANG, Q. C. Advances in cryopreservation of *in vitro* derived propagules: Technologies and explant sources. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 144, p. 7-20, 2021.

WESLEY-SMITH, J.; BERJAK, P.; PAMMENTER, N. W.; WALTERS, C. Intracellular ice and cell survival in cryo-exposed embryonic axes of recalcitrant seeds of *Acer saccharinum*: An ultrastructural study of factors affecting cell and ice structures. **Annals of Botany**, v. 113, n. 4, p. 695-709, 2014.

WYSE, S. V.; DICKIE, J. B.; WILLIS, K. J. Seed banking not an option for many threatened plants. **Nature Plants**, v. 4, p. 848-850, 2018.

CAPÍTULO 2
EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE *Coffea arabica* L. CRIOPRESERVADOS
POR *ENCAPSULATION-DEHYDRATION* E *ENCAPSULATION-*
VITRIFICATION

RESUMO

O café arábica compreende a base da economia de vários países tropicais, incluindo o Brasil, gerando milhares de empregos. No entanto, as projeções climáticas demonstram que ocorrerá mudanças nas áreas de plantio da cultura cafeeira devido as alterações de temperatura e regime hídrico. Dessa forma, é indispensável que os recursos genéticos dessa cultura sejam conservados em longo prazo. Nesse contexto o objetivo desse estudo foi estabelecer um protocolo para a criopreservação de embriões zigóticos de cultivares de *Coffea arabica*, (IAC 62 e IAC 144) por meio das técnicas de *encapsulation-dehydration* e *encapsulation-vitrification*. Para iniciar esse processo os embriões zigóticos foram extraídos das sementes e encapsulados por uma matriz de alginato de sódio e meio de cultivo. Na técnica de *encapsulation-dehydration*, após o pré-cultivo, os embriões zigóticos encapsulados foram desidratados em fluxo laminar por 0, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 horas. Após os tempos de desidratação os explantes foram imersos imediatamente em nitrogênio líquido (-196 °C) ou inoculados em meio de cultivo. Para a técnica de *encapsulation-vitrification*, após o pré-cultivo, os embriões zigóticos encapsulados foram imersos na *Loading Solution* (20 minutos) e posteriormente foram imersos em solução de *Plant vitrification solution 2* (PVS2) por 0, 25, 50, 100, 150 e 200 minutos e imersos em nitrogênio líquido ou inoculados em meio de cultivo. Os explantes foram descongelados em *Recovery Solution* (20 minutos). Foram realizadas avaliações quanto ao comprimento das plântulas, peso e número de folhas, análises anatômicas e bioquímicas, quanto a atividade de enzimas do metabolismo antioxidante (SOD, POD, CAT e APX), quantificação de peróxido de hidrogênio, peroxidação lipídica e teor de prolina. Os resultados indicaram que os embriões zigóticos foram capazes de sobreviver e regenerar após o processo de criopreservação quando desidratados a partir de 8 horas. As plântulas regeneradas de embriões zigóticos criopreservados apresentaram crescimento estatisticamente semelhante ao de plântulas cujos embriões zigóticos não foram criopreservados. As avaliações anatômicas demonstraram uma retração do volume das células do meristema fundamental em decorrência do processo de desidratação e as análises bioquímicas indicaram maior teor de prolina e atividade das enzimas SOD e POD. O conteúdo de peróxido de hidrogênio, peroxidação lipídica e atividade das enzimas CAT e APX não diferiram estatisticamente entre os embriões imersos ou não imersos em nitrogênio líquido. Em relação a técnica de *encapsulation-vitrification*, os embriões zigóticos não foram capazes de sobreviver ao processo de congelamento. Dessa forma conclui-se que é possível criopreservar embriões zigóticos de cultivares de café arábica por meio da técnica de *encapsulation-dehydration*, tendo em vista que o tempo de desidratação e conteúdo de prolina são fatores que contribuíram para a sobrevivência dos explantes ao processo de congelamento.

Palavras-chave: Conservação. Cultivo *in vitro*. Prolina. Enzimas antioxidantes.

ABSTRACT

Arabica coffee comprises the basis of the economy of several tropical countries, including Brazil, generating thousands of jobs. However, climate projections show that changes will occur in coffee plantation areas due to changes in temperature and water regime. Thus, it is essential that the genetic resources of this culture are conserved in the long term. In this context, the objective of this study was to establish a protocol for the cryopreservation of zygotic embryos of cultivars of *Coffea arabica*, (IAC 62 and IAC 144) through the techniques of encapsulation-dehydration and encapsulation-vitrification. To start this process, the zygotic embryos were extracted from the seeds and encapsulated in a sodium alginate matrix and culture medium. In the encapsulation-dehydration technique, after pre-culture, the encapsulated zygotic embryos were dehydrated in laminar flow for 0, 2, 4, 6, 8, 10 and 12 hours. After the dehydration times, the explants were immediately immersed in liquid nitrogen (-196 °C) or inoculated in a culture medium. For the encapsulation-vitrification technique, after pre-culture, the encapsulated zygotic embryos were immersed in Loading Solution (20 minutes) and subsequently immersed in Plant vitrification solution 2 (PVS2) for 0, 25, 50, 100, 150 and 200 minutes and immersed in liquid nitrogen or inoculated in a culture medium. The explants were thawed in Recovery Solution (20 minutes). Evaluations were performed regarding seedling length, weight and number of leaves, anatomical and biochemical analyzes regarding the activity of antioxidant metabolism enzymes (SOD, POD, CAT and APX), quantification of hydrogen peroxide, lipid peroxidation and proline content. The results indicated that the zygotic embryos were able to survive and regenerate after the cryopreservation process when dehydrated after 8 hours. Seedlings regenerated from cryopreserved zygotic embryos showed statistically similar growth to seedlings whose zygotic embryos were not cryopreserved. The anatomical evaluations showed a retraction in the volume of the fundamental meristem cells as a result of the dehydration process and the biochemical analyzes indicated a higher content of proline and activity of SOD and POD enzymes. The hydrogen peroxide content, lipid peroxidation and activity of CAT and APX enzymes did not differ statistically between embryos immersed or not immersed in liquid nitrogen. Regarding the encapsulation-vitrification technique, the zygotic embryos were not able to survive the freezing process. Thus, it is concluded that it is possible to cryopreserve zygotic embryos of arabica coffee cultivars through the encapsulation-dehydration technique, considering that the dehydration time and proline content are factors that contributed to the survival of explants to the freezing process.

Keywords: Conservation. *In vitro* cultivation. Proline. Antioxidant enzymes.

1 INTRODUÇÃO

O café arábica é uma das commodities agrícolas mais comercializadas no mundo, sendo considerado o carro chefe da economia de muitos países tropicais, incluindo o Brasil que responde por cerca de 36% da produção mundial, seguido pelo Vietnã, Colômbia e Indonésia (ICO, 2021). A produtividade do café está associada principalmente a fatores climáticos, de forma que modificações na temperatura e demanda hídrica podem alterar o crescimento vegetativo e ciclo reprodutivo da cultura (TAVARES et al., 2018). Tendo em vista que as mudanças climáticas podem alterar essas variáveis, estima-se que ocorrerão remodelações nas áreas de cultivo, aumento de doenças e pragas, declínio da produtividade, qualidade da bebida e conseqüentemente a subsistência de milhares de famílias de agricultores será comprometida (VAN DER VOSSSEN; BERTRAND; CHARRIER, 2015).

Neste contexto, é importante que o material genético de diferentes cultivares de café arábica sejam conservados, a fim de manter uma fonte de diversidade genética para os sistemas de produção agrícola frente as demandas e desafios futuros no contexto das mudanças ambientais. Dentre os métodos de conservação a criopreservação, que consiste no armazenamento de material biológico em temperaturas ultrabaixas, geralmente em nitrogênio líquido a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ (PANIS; NAGEL; VAN DEN HOUWE, 2020) apresenta-se como uma alternativa viável para a conservação a longo prazo de diferentes tipos de células, tecidos e órgãos vegetais, sem perda de sua viabilidade, tendo em vista que os processos metabólicos são interrompidos, evitando alterações no material genético (COELHO; GONÇALVES; ROMANO, 2020).

O principal obstáculo associado à criopreservação é a formação de cristais de gelo que podem ser letais para as células vegetais (PANIS; NAGEL; VAN DEN HOUWE, 2020). Dessa forma um protocolo de criopreservação eficiente tem que garantir que o material vegetal possa ser resfriado e recuperado de temperaturas ultrabaixas, para isso existem diferentes técnicas que visam reduzir o volume de água celular, a fim de evitar a formação de gelo intracelular, por meio de mecanismos de desidratação física ou pela substituição de moléculas de água por substâncias crioprotetoras, antes da imersão do material vegetal em nitrogênio líquido (RUTA; LAMBARDI; OZUDOGRU, 2020). Dentre as técnicas convencionais a *encapsulation-dehydration* e a *encapsulation-vitrification* são utilizadas com sucesso na criopreservação de diferentes espécies vegetais (CIRINGER et al., 2018). Em ambas as técnicas o material vegetal é encapsulado por uma matriz de alginato de sódio e cloreto de cálcio em um meio contendo altos níveis de sacarose (SHARMA; SHAHZAD; SILVA, 2013). Na técnica de *encapsulation-*

dehydration os explantes são desidratados em câmaras de fluxo laminar (ENGELMANN et al., 2008) e na técnica de *encapsulation-vitrification* os explantes são tratados com soluções crioprotetoras compostas por DMSO, etilenoglicol, sacarose e glicerol (SAKAI; KOBAYASHI; OIYAMA, 1990).

No entanto, um mesmo protocolo de criopreservação não pode ser considerado universal para todas as espécies vegetais, pois a capacidade de sobreviver ao congelamento em nitrogênio líquido difere de espécie para espécie e até mesmo entre diferentes linhagens clonais de uma mesma espécie, dessa forma, tendo em vista que o café arábica é propagado principalmente por sementes e que a reprodução ocorre predominantemente por autopolinização (VAN DER VOSSSEN; BERTRAND; CHARRIER, 2015), o que resulta em progênie muito uniformes, as sementes ou eixos embrionários tornam-se um material muito eficiente para conservação dos recursos genéticos dessa espécie. À vista desses conhecimentos, o objetivo neste estudo foi estabelecer um protocolo para a criopreservação de embriões zigóticos de cultivares de *Coffea arabica*, por meio das técnicas de *encapsulation-dehydration* e *encapsulation-vitrification*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Desinfestação das sementes e excisão dos embriões zigóticos

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas do setor de Fisiologia Vegetal, do Departamento de Biologia, da Universidade Federal de Lavras (UFLA). As sementes de *Coffea arabica* L. cultivares Catuaí amarelo (IAC 62) e Catuaí vermelho (IAC 144) foram obtidas beneficiadas a partir de lavouras da Fazenda experimental da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG).

Para a desinfestação, após a retirada manual do endocarpo (pergaminho), as sementes foram imersas em uma solução de formaldeído (1,5%) por 30 minutos sob agitação constante de 150 rpm a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Foram utilizados 2 mL da solução por semente (FREITAS et al., 2016). Posteriormente, as sementes foram lavadas três vezes em água destilada e autoclavada, e em seguida, foram imersas em solução de ácido bórico 0,5% (p/v), permanecendo nessa solução por 72 horas sob agitação constante de 150 rpm a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ (FREITAS et al., 2016). Após esse período, em câmara de fluxo laminar, as sementes foram lavadas três vezes em água destilada e autoclavada e os embriões zigóticos foram extraídos.

2.2 Criopreservação

2.2.1 Encapsulamento

Para o encapsulamento dos embriões zigóticos, estes foram adicionados a matriz de alginato de sódio [3% (p/v)] composta por sais do meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), com ausência de CaCl_2 , e por 0,4 M de sacarose. Para a complexação da matriz de alginato de sódio, os embriões foram resgatados individualmente com o auxílio de pipeta automática, ajustada para 200 μL , e ponteiros autoclavados e gotejados em solução de cloreto de cálcio (100 mM) na qual permaneceram por 30 minutos. Após a fase de complexação, as cápsulas foram imersas em água para retirada do excesso de cloreto de cálcio. Todas as soluções foram preparadas com água ultra pura autoclavada.

2.2.2 Encapsulation-dehydration

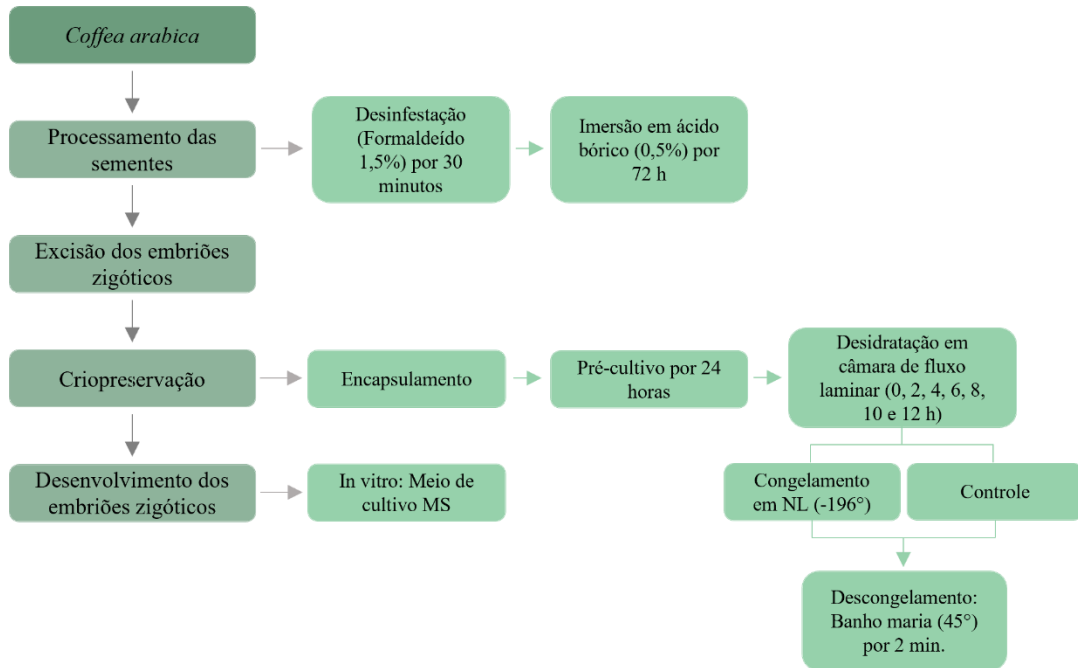
Os embriões encapsulados foram transferidos para frascos do tipo erlenmeyer de volume de 250 mL envolto por papel alumínio, contendo 100 mL de meio MS, suplementado por 0,5 M de sacarose. Os explantes permaneceram na solução de pré-tratamento por 24 horas sob agitação constante de 150 rpm.

Terminado o período de pré-tratamento os embriões zigóticos encapsulados foram transferidos para placas de petri autoclavadas. As placas foram dispersas em câmara de fluxo laminar para a desidratação dos explantes por 0, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 horas. Após o período correspondente de desidratação parte dos embriões encapsulados foi transferida para criotubos de volume de 2 mL e imersos imediatamente em nitrogênio líquido ($-196\text{ }^\circ\text{C}$), onde permaneceram por no mínimo 24 horas. Os embriões encapsulados foram descongelados em banho maria por 2 minutos e posteriormente inoculados em meio MS, suplementado por 30 g L^{-1} de sacarose, 1,5 g L^{-1} de carvão ativado e solidificado por 2,5 g L^{-1} de phytigel[®]. O pH do meio de cultivo foi ajustado para $5,8 \pm 0,1$ e submetido à esterilização em autoclave a temperatura de $121\text{ }^\circ\text{C}$ e 1 atm de pressão por 20 minutos. Os embriões encapsulados não criopreservados foram diretamente inoculados no meio MS após o período de desidratação.

Para inferir se a aplicação da técnica de *encapsulation-dehydration* empregada para a criopreservação de embriões zigóticos de *Coffea arabica* cv. Catuaí amarelo (IAC 62) seria aplicável à outras cultivares, a mesma metodologia foi aplicada para a cultivar Catuaí vermelho (IAC-144).

As principais etapas do processo de criopreservação de embriões zigóticos de *Coffea arabica* por meio da técnica de *encapsulation-dehydration* estão representados na figura 1.

Figura 1 – Etapas do processo de criopreservação de embriões zigóticos de *Coffea arabica* L. por meio da técnica de *encapsulation-dehydration*.



Fonte: Do autor (2021).

O teor de umidade correspondente ao tempo de desidratação dos explantes foi calculada de acordo com a equação indicada abaixo:

$$\text{Teor de umidade (\% peso fresco)} = (PF_{t_x} - PS / PF_{t_0}) \times 100$$

Onde PF_{t_0} corresponde ao peso inicial dos explantes, antes do início do processo de desidratação, FW_{t_x} peso dos explantes após determinado período de desidratação e PS corresponde ao peso seco dos explantes após desidratação total em estufa de circulação forçada (GONZALEZ-ARNAO; ENGELMANN, 2006).

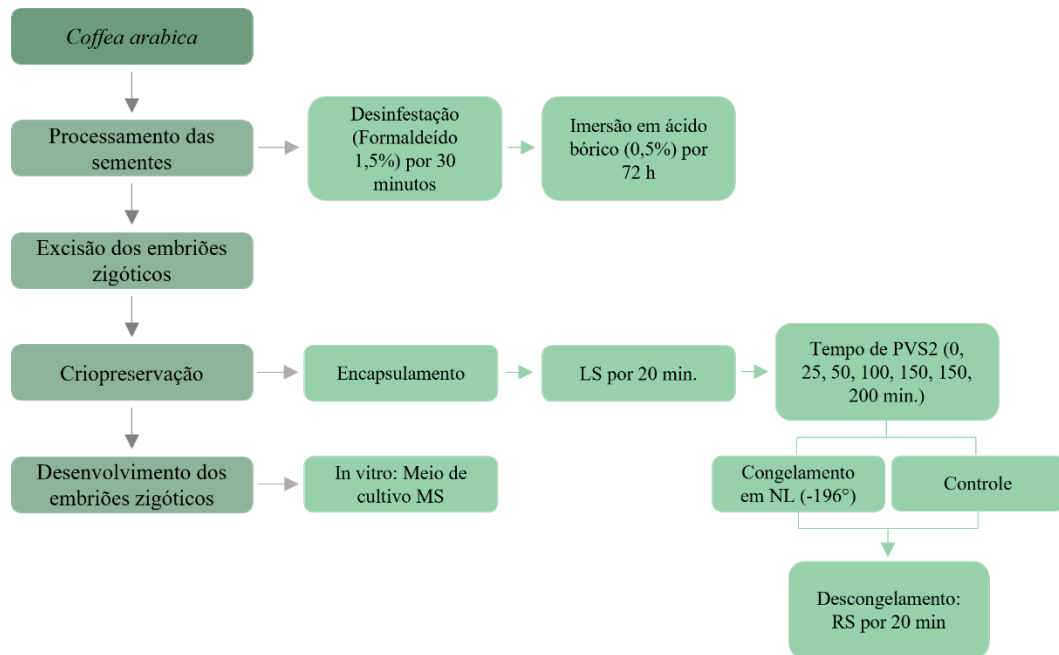
2.2.3 Encapsulation-vitrification

Os embriões zigóticos encapsulados foram expostos a *Loading Solution* (LS), constituída por 2M de glicerol + 0.4 M de sacarose em MS líquido (MATSUMOTO; SAKAI; YAMADA, 1994) por 20 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente foram imersos em solução de *Plant vitrification solution 2* (PVS2), constituída por 30% de glicerol + 15% etileno glicol + 15% DMSO + 0,4 M de sacarose em MS líquido (SAKAI; KOBAYASHI; OIYAMA, 1990) a 0°C em diferentes intervalos de tempo: 0, 25, 50, 100, 150 e 200 minutos. Após cada intervalo de tempo os embriões encapsulados de cada tratamento foram colocados em criotubos de 2 mL contendo 1 mL de PVS2 e imersos em nitrogênio líquido (NL) (-196° C) por no mínimo 24 horas. Após o período de congelamento, os embriões foram descongelados em *Recovery Solution* (RS), constituída por 1,2 M sacarose dissolvida em MS líquido (SAKAI; KOBAYASHI; OIYAMA, 1990) por 20 minutos em temperatura ambiente. Os embriões encapsulados não imersos em nitrogênio líquido (não criopreservados) foram imersos diretamente em RS. Após o período de imersão em RS os embriões encapsulados foram inoculados em meio MS, suplementado por 30 g L⁻¹ de sacarose, 1,5 g L⁻¹ de carvão ativado e solidificado por 2,5 g L⁻¹ de phytigel®. O pH do meio de cultivo foi ajustado para 5,8 ± 0,1 e submetido à esterilização em autoclave a temperatura de 121°C e 1 atm de pressão por 20 minutos.

Para inferir se a aplicação da técnica de *encapsulation-vitrification* empregada para a criopreservação de embriões zigóticos de *Coffea arabica* cv. Catuaí amarelo (IAC 62) seria aplicável à outras cultivares, a mesma metodologia foi aplicada para a cultivar Catuaí vermelho (IAC-144).

Principais etapas do processo de criopreservação de embriões zigóticos de *Coffea arabica* por meio da técnica de *encapsulation-vitrification* estão representadas na figura 2.

Figura 2 – Etapas do processo de criopreservação de embriões zigóticos de *Coffea arabica* L. por meio da técnica de *encapsulation-vitrification*.



Fonte: Do autor (2021).

2.2.4 Condições de cultivo

Após a inoculação dos embriões zigóticos em meio de cultivo, as culturas permaneceram por 6 dias no escuro e posteriormente foram transferidas para salas de crescimento em condições de fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25 °C +/- 2°C, com irradiância no topo dos recipientes de cultura fornecidos por lâmpadas de LED branca (9 W).

Foram realizadas avaliações quanto à porcentagem de sobrevivência e regeneração dos embriões zigóticos (desenvolvimento da parte aérea e radícula) após 8 dias de cultivo e aos 150 dias de cultivo foram realizadas avaliações quanto ao comprimento da parte aérea e raízes (cm), número de folhas e peso fresco total (g).

2.3 Análise anatômica

Para os estudos anatômicos as amostras foram fixadas em álcool 70°GL e posteriormente desidratadas em série etílica crescente e incluídas em metacrilato (Historesina, Leica Instruments, Heidelberg, Alemanha).

Foram realizados cortes longitudinais dos embriões zigóticos de *Coffea arabica* L. cv. catuaí amarelo que foram encapsulados, desidratados por 0, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 horas e imersos ou não em nitrogênio líquido. Somente o eixo radicular foi demonstrado nas figuras, tendo em vista que o processo de desidratação promove o curvamento do cotilédone, o que dificulta a realização dos cortes. Os cortes foram realizados em micrótomo rotativo de avanço automático com espessura de 10 μ m e corados com azul de toluidina (O'BRIEN; FEDER; MCCULLY 1964).

2.4 Determinação do conteúdo de peróxido de hidrogênio e malondialdeído

Após 7 dias de cultivo, os embriões zigóticos em desenvolvimento do tratamento controle (não criopreservado) e do melhor tratamento resultante do tempo de desidratação/criopreservação, foram coletados, acondicionados em nitrogênio líquido e armazenados em ultra freezer a -80 °C para as análises bioquímicas.

Para determinação do conteúdo de peróxido de hidrogênio e malondialdeído, 0,2 mg de matéria fresca foram maceradas em nitrogênio líquido com polivinil polipirrolidona (PVPP), homogeneizados em 1,5 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (m/v) e centrifugados a 12.000 g por 15 minutos, a 4 °C para obtenção do extrato. O peróxido de hidrogênio (H₂O₂) foi determinado medindo-se a absorbância a 390 nm em um meio de reação, contendo 90 μ L do extrato, 90 μ L do tampão fosfato de potássio 10 mM, pH 7,0 180 μ L de iodeto de potássio 1M (VELIKOVA; YORDANOV; EDREVA, 2000). A quantificação foi realizada, com base na curva padrão de peróxido de hidrogênio.

A peroxidação lipídica foi determinada por meio da quantificação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (Buege e Aust 1978). Cerca de 0,2 mg do material vegetal foram macerados em nitrogênio líquido, acrescido de PVPP (m/v) e homogeneizados em 1,5 mL de TCA 0,1% (m/v). O homogeneizado foi centrifugado a 10.000 g, por 10 minutos para obtenção do extrato. Alíquotas (125 μ L) do extrato foram adicionadas ao meio de reação, contendo 0,5% (m/v) de ácido tiobarbitúrico (TBA) e 10% (m/v) de TCA, incubando-se, em seguida, em banho-maria a 95°C, por 30 minutos. A reação foi paralisada por resfriamento rápido em gelo e as leituras foram realizadas em espectrofotômetro, a 535 nm e 600 nm. O TBA forma complexos de cor avermelhada com aldeídos de baixa massa molecular, como o malondialdeído (MDA), o produto secundário do processo de peroxidação. Dessa forma a concentração do complexo MDA/TBA pode ser calculada pela equação: $[MDA] = (A_{535} - A_{600}) / (\epsilon \cdot b)$, em que: ϵ (coeficiente de extinção molar = 1,56 x 10⁻⁵ cm⁻¹); b (comprimento ótico = 1).

2.5 Determinação da atividade de enzimas do metabolismo antioxidante

Após 7 dias de cultivo, os embriões zigóticos em desenvolvimento do tratamento controle (não criopreservado) e do melhor tratamento resultante do tempo de desidratação/criopreservação, foram coletados, acondicionados em nitrogênio líquido e armazenados em ultra freezer a -80 °C para as análises bioquímicas.

O extrato enzimático foi obtido pela maceração em nitrogênio líquido de 0,2 g de material fresco de embriões zigóticos, sendo adicionados 1,5 mL do tampão de extração contendo: 375 µL de tampão fosfato de potássio (400 mM e pH 7,8), 15 µL de EDTA (10 mM), 75 µL de ácido ascórbico (200 mM), e 1035 µL de água. O extrato foi centrifugado a 13.000 g por 10 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi coletado para as análises enzimáticas da dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX) e peroxidase do guaiacol (POD) (BIEMELT; KEETMAN; ALBRECHT, 1998).

A atividade da SOD foi avaliada pela capacidade da enzima em inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT), onde alíquotas do sobrenadante foram adicionadas ao meio de incubação composto por tampão fosfato de potássio (100 mM e pH 7,8), metionina (70 mM), EDTA (10 µM), NBT (1 mM), riboflavina (0,2 mM) e água. As amostras juntamente com o meio de reação foram iluminadas por uma lâmpada fluorescente de 20 W durante 7 minutos e as leituras foram realizadas a 560 nm (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977). O cálculo da enzima foi realizado por meio da seguinte equação: % de inibição = $(A_{560} \text{ amostra com extrato enzimático} - A_{560} \text{ controle sem enzima}) / (A_{560} \text{ controle sem enzima})$. Uma unidade da SOD corresponde à quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a fotorredução do NBT nas condições do ensaio.

A CAT foi avaliada, segundo Havir e McHale (1987), onde uma alíquota do extrato enzimático foi adicionada ao meio de incubação, contendo tampão fosfato de potássio (200 mM e pH 7,0), peróxido de hidrogênio (250 mM) e água. A atividade da enzima foi determinada pelo decréscimo na absorbância a 240 nm, a cada 15 segundos, por 3 minutos, monitorado pelo consumo de peróxido de hidrogênio. O coeficiente de extinção molar utilizado foi 36 mM⁻¹cm⁻¹.

A atividade da APX foi determinada pelo acompanhamento da taxa de oxidação do ascorbato a 290 nm, a cada 15 segundos, por 3 minutos. Uma alíquota do extrato enzimático foi adicionada ao meio de incubação, composto por tampão fosfato de potássio (200 mM e pH 7,0), ácido ascórbico (10 mM), peróxido de hidrogênio (2 mM) e água (NAKANO; ASADA, 1981). O coeficiente de extinção molar utilizado foi 2,8 mM⁻¹cm⁻¹.

A atividade da POD foi determinada pelo acompanhamento do aumento da absorbância a 470 nm por 2 min, em intervalos de 15 segundos, onde uma alíquota do extrato enzimático foi adicionada ao meio de incubação constituído por tampão fosfato de sódio (0,1 M e pH 6), guaiacol (0,2 M), peróxido de hidrogênio (0,03 M), segundo protocolo adaptado de Nakano & Asada (1981). A atividade enzimática foi calculada com base no fator de extinção de $26,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2.6 Determinação do conteúdo de prolina

Para extração, após 7 dias de cultivo, os embriões zigóticos em desenvolvimento do tratamento controle (não criopreservado) e do melhor tratamento resultante do tempo de desidratação/criopreservação foram coletados. O material vegetal (100 mg de matéria fresca) foi macerado em ácido sulfosalicílico 3%. As amostras foram centrifugadas a 5000 g por 10 minutos e o sobrenadante coletado para quantificação.

A quantificação de prolina foi realizada por meio do método de Bates, Waldren e Teare (1973) com base na curva padrão com concentrações crescentes e conhecidas de prolina.

2.7 Delineamento experimental

Os experimentos foram conduzidos em Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) com cinco repetições por tratamento, sendo cada repetição constituída por cinco explantes. Os dados obtidos foram submetidos à análise da variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% ($P < 0,05$). Os cálculos foram realizados com auxílio do software Sisvar (Ferreira, 2014).

3 RESULTADOS

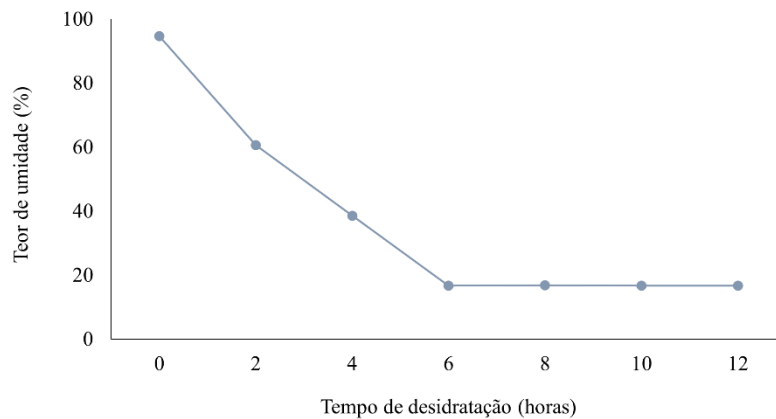
3.1 *Coffea arabica* L. cv. Catuaí amarelo (IAC 62)

3.1.1 *Encapsulation-dehydration*

3.1.1.1 Sobrevivência após descongelamento

Os dados obtidos em referência ao teor de umidade demonstram que a partir do tempo de 6 horas de dessecação não há diferença de teor de umidade entre os explantes encapsulados, ou seja, nos tempos de 6, 8, 10 e 12 horas de desidratação os explantes atingem o máximo de perda de água, apresentando teor de umidade de cerca de 17%. (Figura 3).

Figura 3 – Teor de umidade de embriões zigóticos encapsulados de *Coffea arabica* L. cv. catuaí amarelo (IAC-62).

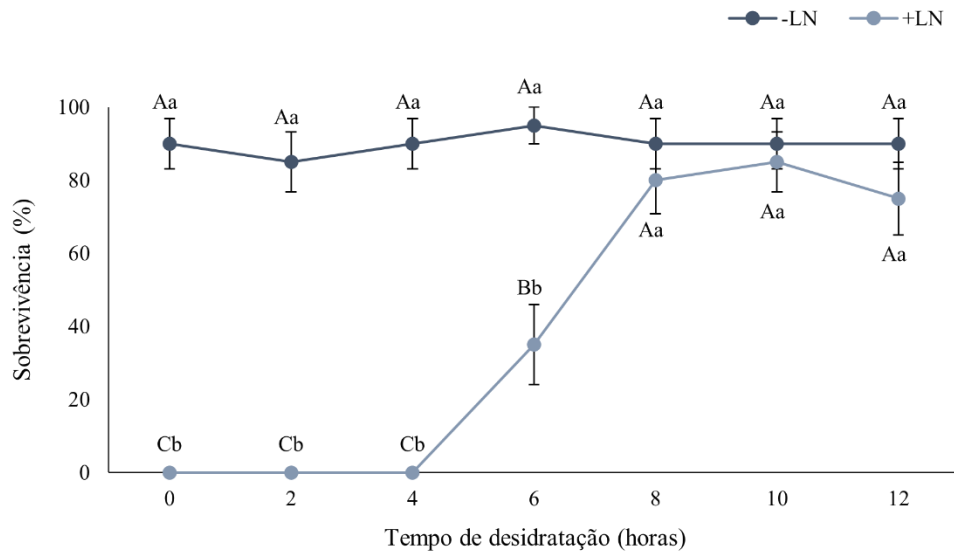


Legenda: Teor de umidade de embriões zigóticos de *Coffea arabica* L. cv. catuaí amarelo (IAC-62) encapsulados e desidratados em câmara de fluxo laminar por 0, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 horas.

Fonte: Do autor (2021).

Os embriões zigóticos encapsulados e imersos em nitrogênio líquido, sobreviveram ao processo de criopreservação a partir de 6 horas de desidratação, observando-se que à medida que o tempo de desidratação aumentou, a porcentagem de sobrevivência é estatisticamente igual à dos embriões não imersos em nitrogênio líquido (Figura 4). Nos tempos de 8, 10 e 12 horas de desidratação a porcentagem de sobrevivência dos embriões zigóticos criopreservados foi de 80%, não apresentando diferenças significativas quando comparados entre si e aos de embriões zigóticos não criopreservados.

Figura 4 – Sobrevivência de embriões zigóticos após imersão em nitrogênio líquido.



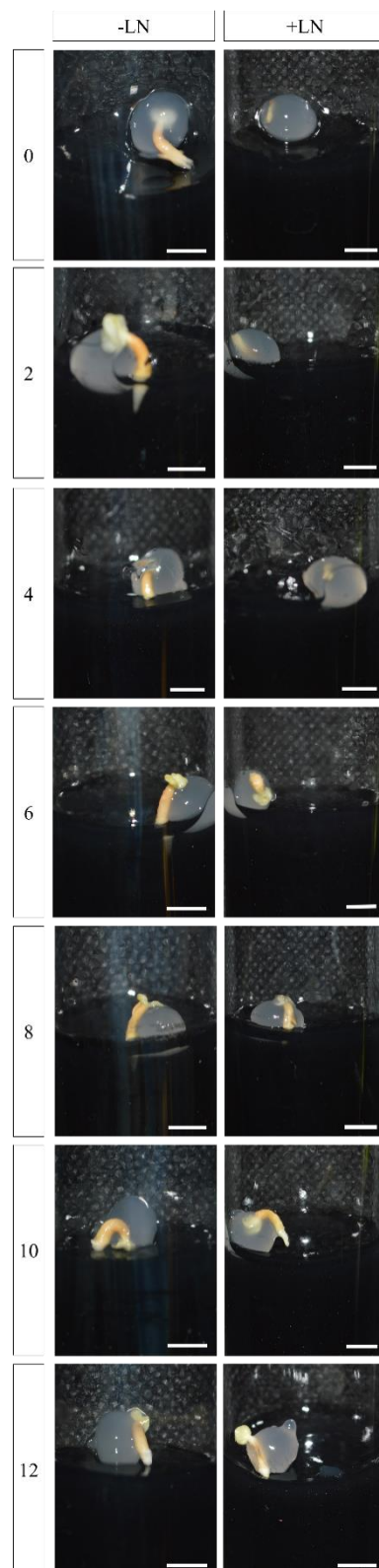
Legenda: Efeito do tempo de desidratação (0, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 horas) de embriões zigóticos de *Coffea arabica* L. cv. Catuaí amarelo (IAC 62) não imersos em nitrogênio líquido (-LN) ou imersos em nitrogênio líquido (+LN) na porcentagem de sobrevivência dos embriões. Médias seguidas da mesma letra maiúscula (tempo de desidratação) e médias seguidas da mesma letra minúscula (imersos ou não em nitrogênio líquido) não apresentam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Fonte: Do autor (2021).

Em relação aos embriões zigóticos encapsulados, não imersos em nitrogênio líquido, a desidratação não afetou a sobrevivência destes, tendo em vista que não foram observadas diferenças significativas entre os tempos de desidratação (2, 4, 6, 8, 10 e 12 horas), quando comparados ao controle, não desidratado, não criopreservado (Figura 4).

Aos 8 dias de cultivo é possível observar que os embriões zigóticos que foram desidratados por 0, 2 e 4 horas e imersos em nitrogênio líquido, apresentam aspecto oxidado que inviabiliza o seu desenvolvimento (Figura 5). Nos demais tratamentos, observa-se o desenvolvimento da radícula e expansão dos cotilédones, tanto dos embriões criopreservados quanto dos embriões não criopreservados (Figura 5). Deste modo constata-se que a redução da umidade é essencial para a sobrevivência dos embriões zigóticos imersos em nitrogênio líquido.

Figura 5 – Desenvolvimento *in vitro* de embriões zigóticos de *Coffea arabica* L. cv. Catuaí amarelo (IAC 62), 8 dias após o processo de criopreservação.



Legenda: Efeito do tempo de desidratação (0, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 horas) no desenvolvimento de embriões zigóticos de *Coffea arabica* L. cv. Catuaí amarelo (IAC 62), não imersos em nitrogênio líquido (-LN) ou imersos em nitrogênio líquido (+LN), após 8 dias de cultivo *in vitro*. Barra = 0,5 cm.

Fonte: Do autor (2021).

A análise histológica do eixo radicular do embrião zigótico, demonstra uma camada protodérmica com células justapostas e núcleos evidentes, internamente a protoderme, observa-se a região do meristema fundamental formado por células com diâmetros maiores, do que as células que formam a protoderme, e os núcleos são evidentes (Figura 6a). O procâmbio é formado por células alongadas, estreitas e os núcleos também são evidentes (Figura 6a). Internamente ao procâmbio observa-se no meristema fundamental a presença de células alongadas, com núcleos visíveis (Figura 6a), essas células apresentam uma murcha à medida que o tempo de desidratação aumenta, apresentando-se mais estreitas quando comparadas ao tratamento cujos embriões não foram desidratados (Figura 6). Essa murcha é observada independentemente de serem imersas ou não em nitrogênio líquido.

Figura 6 – Corte anatômicos de embriões zigóticos de *Coffea arabica* L. cv. catuaí amarelo (Continua).

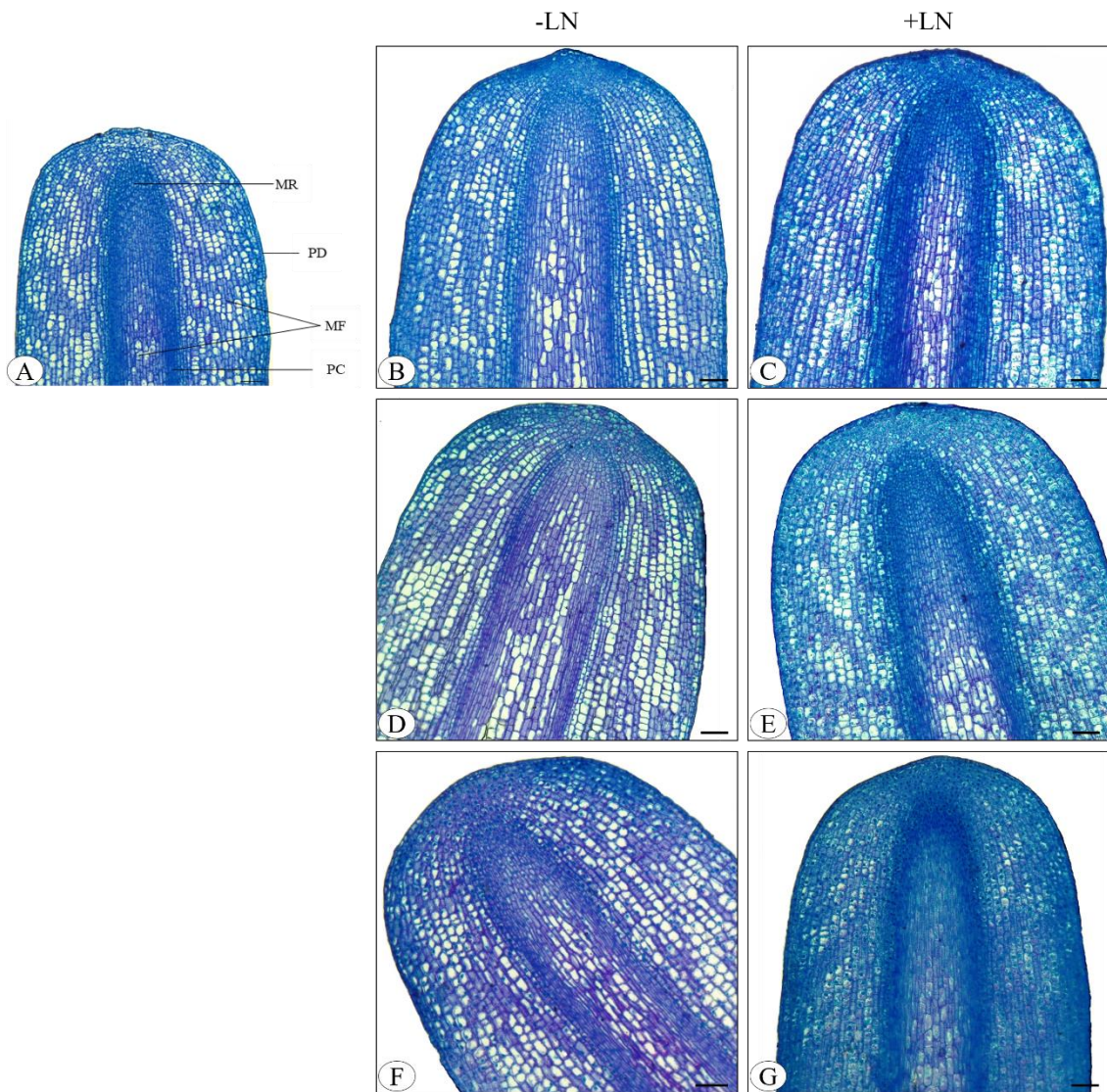
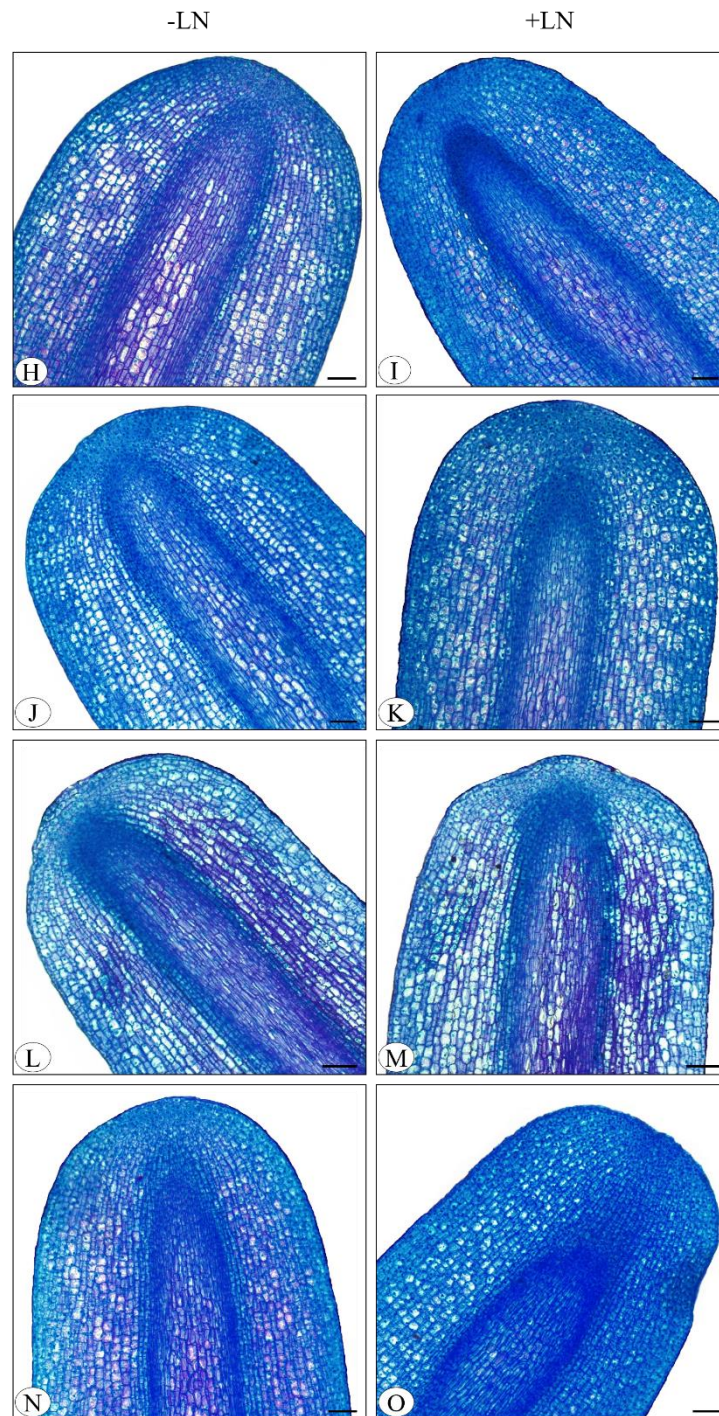


Figura 6 – Corte anômicos de embriões zigóticos de *Coffea arabica* L. cv. catuaí amarelo (Conclusão).



Legenda: Corte longitudinal de embriões zigóticos de *Coffea arabica* L. cv. Catuaí amarelo (IAC 62). Embrião que não foi encapsulado (A). Embriões que foram encapsulados e desidratados por 0 (B e C), 2 (D e E), 4 (F e G), 6 (H e I), 8 (J e K), 10 (L e M) e 12 (N e O) horas e não imersos em nitrogênio líquido (LN-) ou imersos em nitrogênio líquido (LN+). PD = protoderme; PC = procâmbio; MF = meristema fundamental; MR = meristema apical radicular. Barra = 100 μ M.

Fonte: Do autor (2021).

3.1.1.2 Desenvolvimento dos embriões zigóticos após descongelamento

O processo de criopreservação não afetou o desenvolvimento dos embriões zigóticos, a partir do tempo de 8 horas de desidratação, tendo em vista que o comprimento da parte aérea e raízes, número de folhas e peso fresco total das plântulas cujos embriões foram imersos em nitrogênio líquido não diferiu estatisticamente dos tratamentos cujos embriões zigóticos não foram imersos em nitrogênio líquido (Figura 7).

Figura 7 – Crescimento *in vitro* de plântulas de *Coffea arabica* L. cv. Catuaí amarelo (IAC 62) após o processo de criopreservação (Continua).

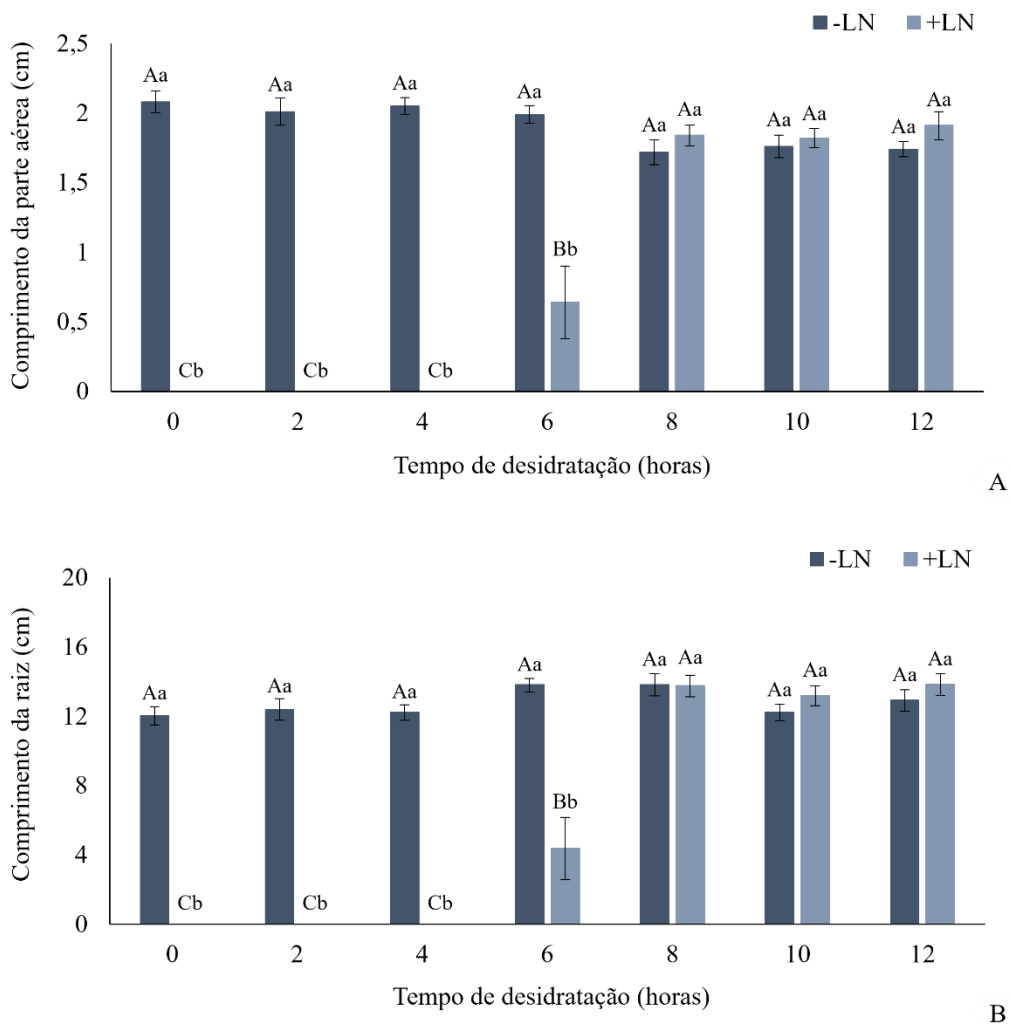
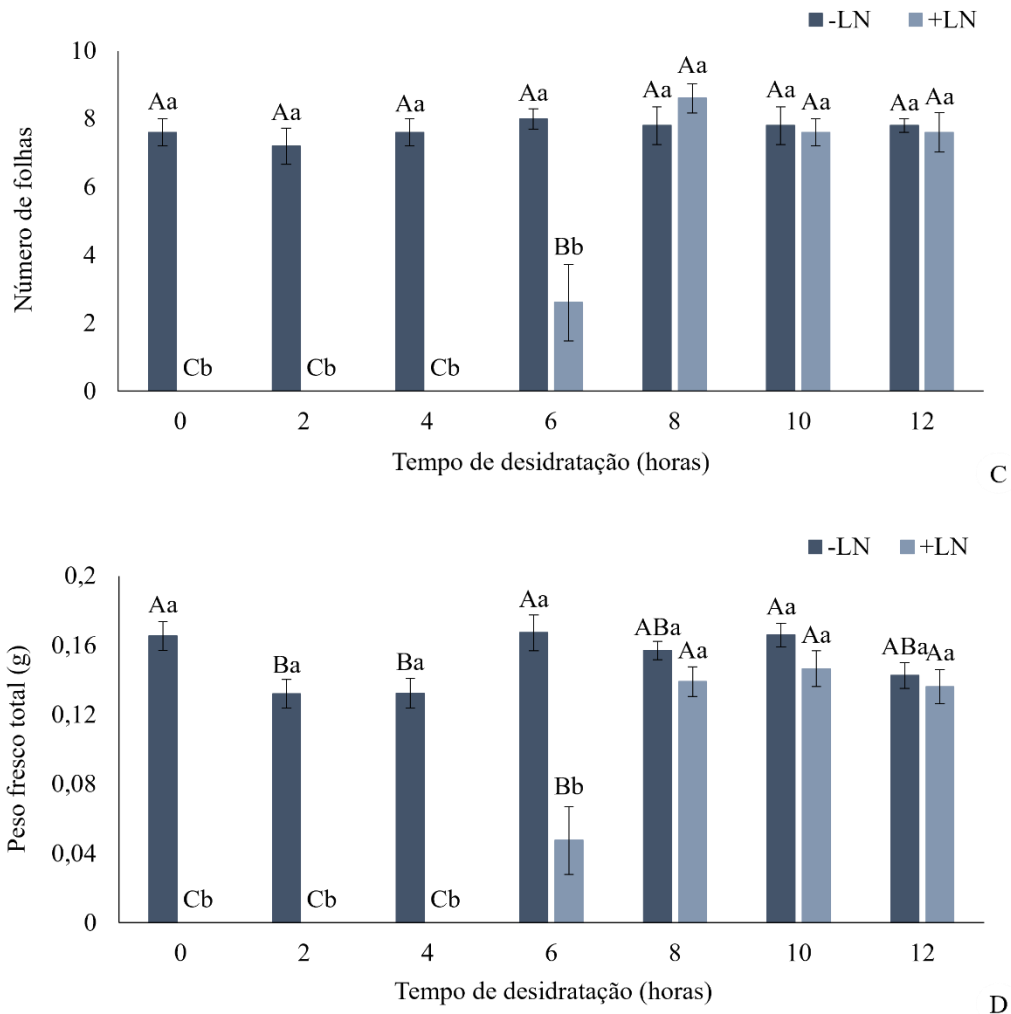


Figura 7 – Crescimento *in vitro* de plântulas de *Coffea arabica* L. cv. Catuaí amarelo (IAC 62) após o processo de criopreservação (Conclusão).



Legenda: Efeito do tempo de desidratação (0, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 horas) de embriões zigóticos de *Coffea arabica* L. cv. Catuaí amarelo (IAC 62) não imersos em nitrogênio líquido (-LN) ou imersos em nitrogênio líquido (+LN) no crescimento da parte aérea (A), raiz (B), número de folhas (C) e peso fresco total (D), após 150 dias de cultivo. Médias seguidas da mesma letra maiúscula (tempo de desidratação) e médias seguidas da mesma letra minúscula (imersas ou não em nitrogênio líquido) não apresentam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

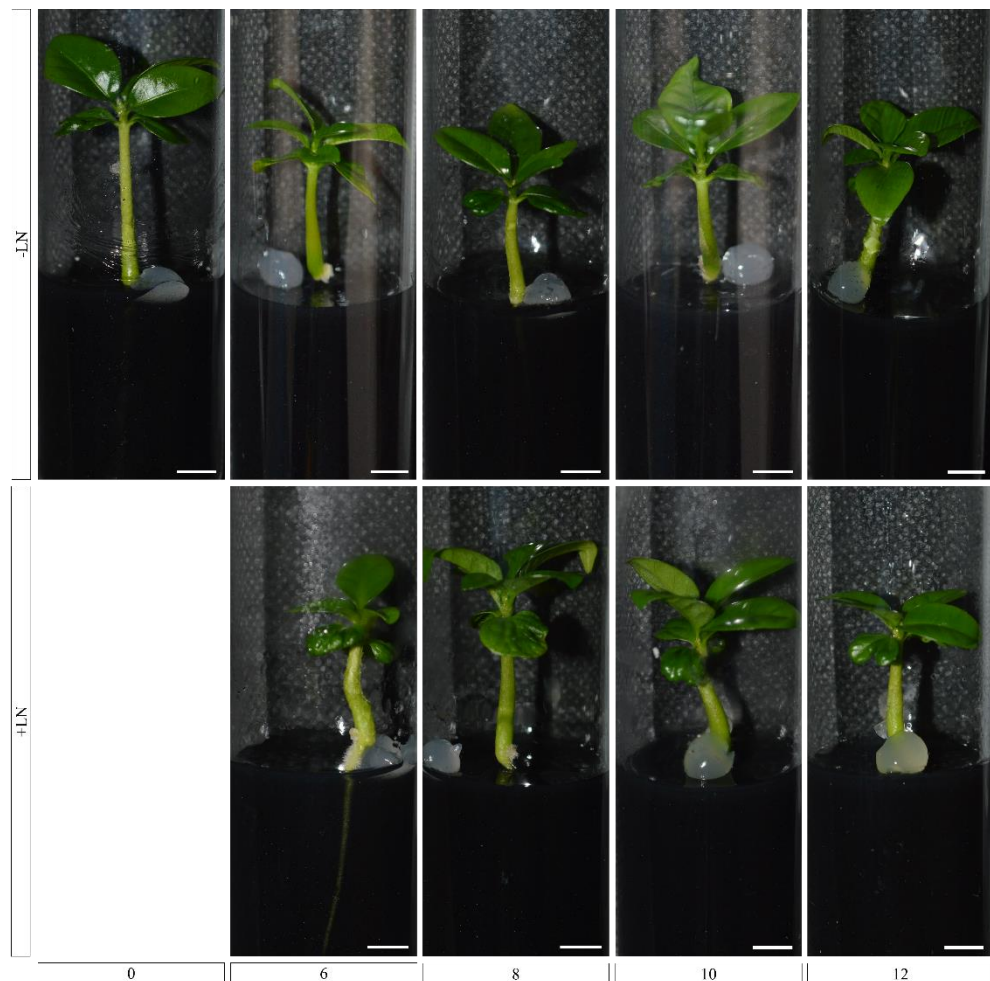
Fonte: Do autor (2021).

O comprimento da parte aérea e raiz, número de folhas e peso fresco total das plântulas dos tratamentos de 8, 10 e 12 horas de desidratação e criopreservados não apresentaram diferenças significativas entre si. Também não foram observadas diferenças significativas entre os tempos de desidratação de embriões zigóticos que não foram criopreservados (Figura 7). Somente as plântulas do tratamento de 6 horas de desidratação e imersão em nitrogênio líquido

apresentaram menor comprimento de parte aérea e raízes, número de folhas e peso total em relação as plântulas do tratamento não imerso em nitrogênio líquido (Figura 7).

Após 150 dias de cultivo *in vitro*, as plântulas apresentavam uma média de 2 cm de comprimento de parte aérea, 13 cm de comprimento de raiz, 8 folhas e aproximadamente 0,15 g de peso fresco total. As plântulas não apresentavam aspecto vítreo e nem indícios de oxidação e as folhas estavam expandidas sem manchas de necrose (Figura 8).

Figura 8 – Plântulas de *Coffea arabica* L. cv. Catuaí amarelo (IAC 62), 150 dias após o processo de criopreservação.



Legenda: Plântulas de *Coffea arabica* L. cv. Catuaí amarelo (IAC 62), cujos embriões zigóticos não foram imersos em nitrogênio líquido (-LN) ou imersos em nitrogênio líquido (+LN) após 0, 6, 8, 10 e 12 horas de desidratação. Barra 0,5 cm.

Fonte: Do autor (2021).

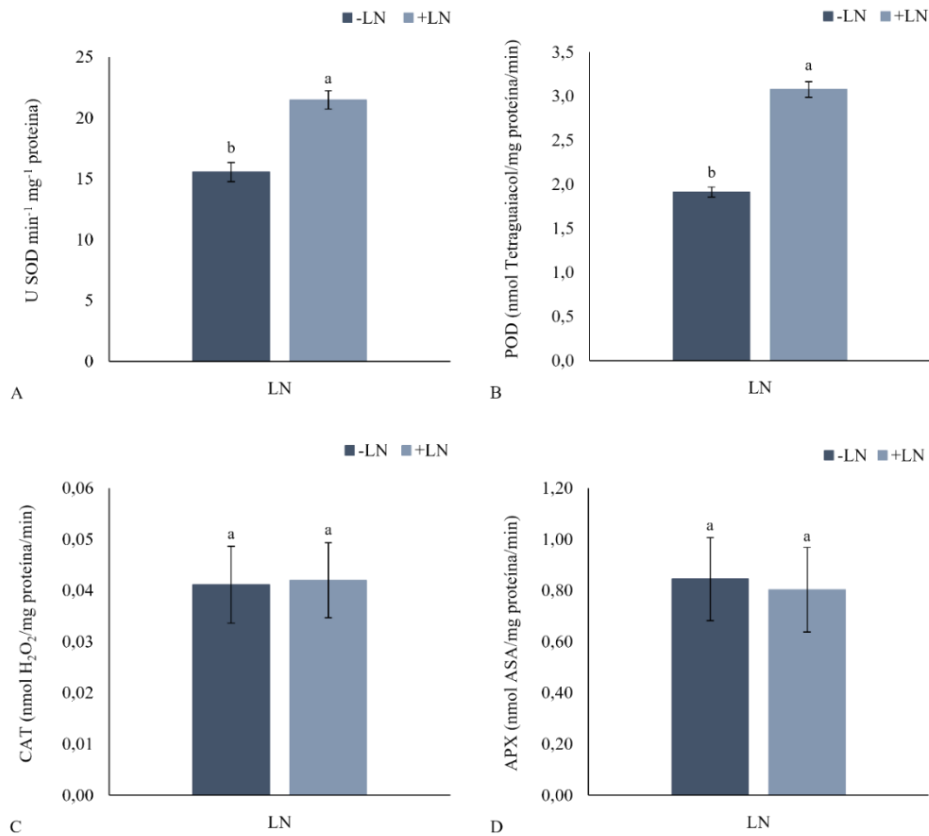
3.1.1.3 Análise bioquímica

Com base nos resultados obtidos, onde foi evidenciado que os embriões zigóticos desidratados por 8, 10 e 12 horas e imersos em nitrogênio líquido, não apresentaram diferenças entre si, quanto ao desenvolvimento dos embriões e formação das plântulas, somente os explantes do tratamento de 8 horas de desidratação foram selecionados para avaliação bioquímica. Aos 7 dias, explantes do tratamento controle (embrião não desidratado e não criopreservado) e do tratamento de 8 horas de desidratação foram coletados para análise.

A quantificação de peróxido de hidrogênio e de peroxidação lipídica demonstrou que aos 7 dias de cultivo, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos de embriões criopreservados e não criopreservados.

Em relação as análises das enzimas do metabolismo antioxidante. Aos 7 dias de cultivo, observou-se que o tratamento cujos embriões foram imersos em nitrogênio líquido apresentava uma maior atividade específica das enzimas SOD e POD quando comparados ao tratamento cujos embriões não foram imersos em nitrogênio líquido (Figura 9). No entanto, não foram observadas diferenças na atividade específica das enzimas CAT e APX entre os embriões imersos ou não imersos em nitrogênio líquido (Figura 9).

Figura 9 – Atividade específica de enzimas antioxidantes de embriões zigóticos de *Coffea arabica* L. cv. Catuaí amarelo (IAC 62) após o processo de criopreservação.

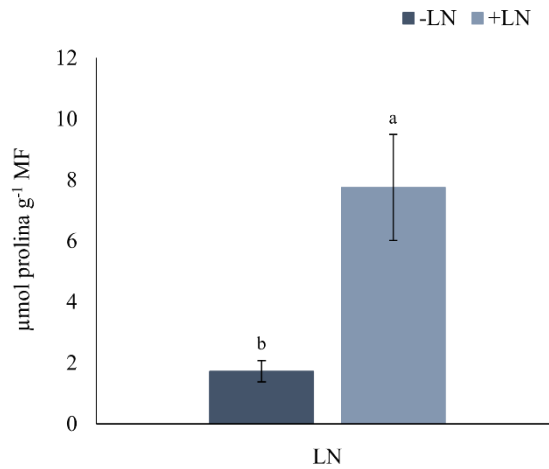


Legenda: Atividade específica das enzimas antioxidantes, (A) superóxido dismutase (SOD), (B) peroxidase do guaiacol (POD), (C) catalase (CAT) e (D) peroxidase do ascorbato (APX), de embriões zigóticos de *Coffea arabica* L. cv. Catuaí amarelo (IAC 62) imersos em nitrogênio líquido (LN+) ou não imersos em nitrogênio líquido (LN-) após 7 dias de cultivo. Médias seguidas da mesma letra não apresentam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Fonte: Do autor (2021).

O nível de prolina também foi maior nos tratamentos cujos embriões zigóticos foram imersos em nitrogênio líquido, quando comparado ao tratamento cujos embriões não foram submetidos ao resfriamento (Figura 10).

Figura 10 – Quantificação de prolina em embriões zigóticos de *Coffea arabica* L. cv. Catuaí amarelo (IAC 62) após o processo de criopreservação.



Legenda: Quantificação de prolina em embriões zigóticos de *Coffea arabica* L. cv. Catuaí amarelo (IAC 62) imersos em nitrogênio líquido (LN+) ou não imersos em nitrogênio líquido (LN-) após 7 dias de cultivo. Médias seguidas da mesma letra não apresentam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Fonte: Do autor (2021).

3.1.2 Encapsulation-vitrification

Os resultados demonstraram que 100% dos embriões zigóticos criopreservados não sobreviveram ao processo de congelamento em nitrogênio líquido, independentemente do tempo em PVS2. Em contrapartida 100% dos embriões zigóticos não criopreservados foram capazes de romper a cápsula e prosseguir o desenvolvimento da parte aérea e raiz.

3.2 *Coffea arabica* L. cv. Catuaí vermelho (IAC 144)

3.2.1 Encapsulation-dehydration

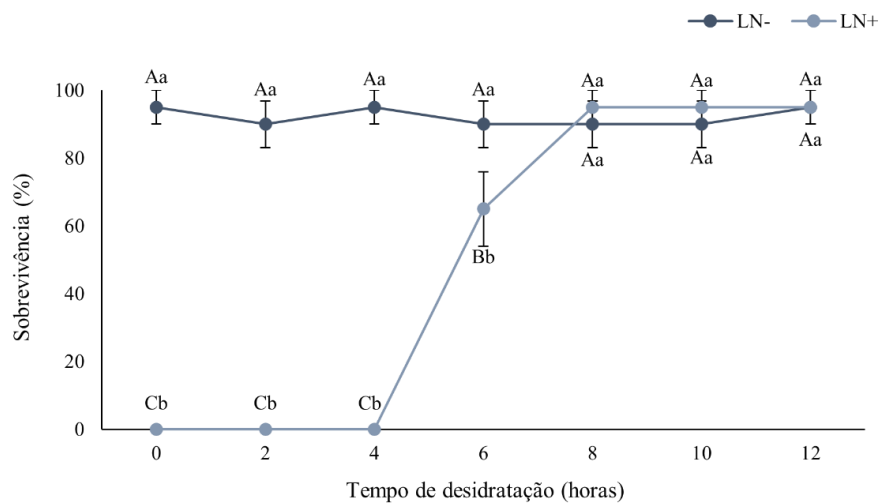
3.2.1.1 Sobrevivência após descongelamento

O teor de umidade dos explantes encapsulados não variou nos tempos de 6, 8, 10 e 12 horas apresentando aproximadamente 17% de teor de água ao final do tempo de desidratação.

Assim como observado para a cultivar IAC-62, os embriões zigóticos da cultivar IAC-144 sobreviveram ao processo de criopreservação por meio da técnica de *encapsulation-dehydration*. Nos tempos de 8, 10 e 12 horas de desidratação a sobrevivência foi de 95%, não

diferindo estatisticamente da sobrevivência dos embriões zigóticos não criopreservados (Figura 11). O tempo de desidratação dos embriões encapsulados não imersos em nitrogênio líquido não afetou a sobrevivência destes, tendo em vista que não foram observadas diferenças significativas entre os tempos de desidratação (2, 4, 6, 8, 10 e 12 horas), quando comparados ao controle (Figura 11).

Figura 11 – Sobrevivência de embriões zigóticos após imersão em nitrogênio líquido.

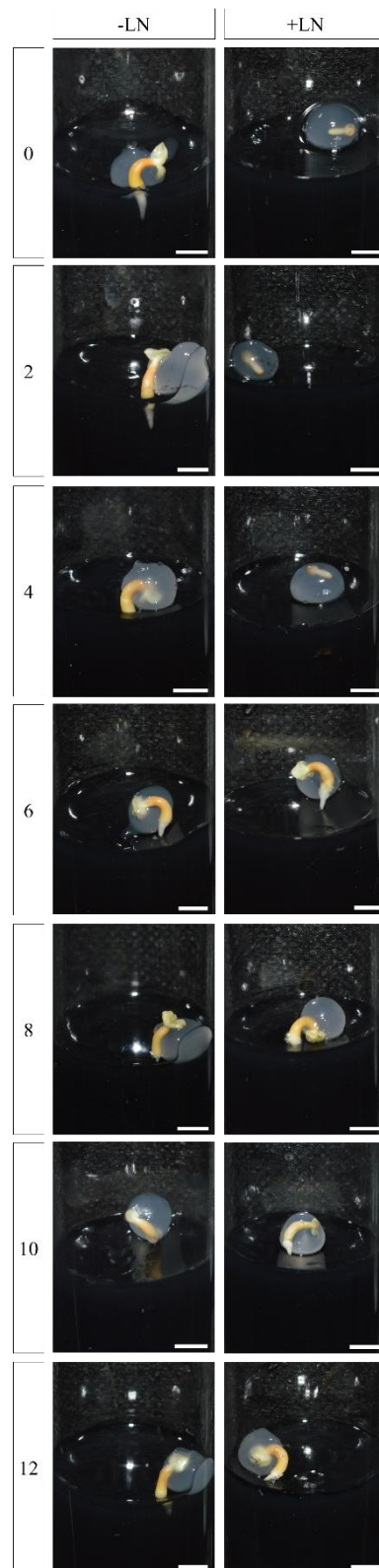


Legenda: Efeito do tempo de desidratação (0, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 horas) de embriões zigóticos de *Coffea arabica* L. cv. Catuaí vermelho (IAC 144), não imersos em nitrogênio líquido (-LN) ou imersos em nitrogênio líquido (+LN), na porcentagem de sobrevivência dos embriões. Médias seguidas da mesma letra maiúscula (tempo de desidratação) e médias seguidas da mesma letra minúscula (imersas ou não em nitrogênio líquido) não apresentam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Fonte: Do autor (2021).

Observando o aspecto morfológico dos embriões zigóticos criopreservados após 8 dias de cultivo nota-se que, os embriões que foram desidratados por 0, 2 e 4 horas e imersos em nitrogênio líquido, apresentam aspecto oxidado, indicando morte celular, tendo em vista que estes embriões não desenvolvem parte aérea e raiz (Figura 12). Nos demais tratamentos, observa-se o desenvolvimento da radícula e expansão dos cotilédones, tanto dos embriões criopreservados quanto dos embriões não criopreservados (Figura 12).

Figura 12 – Desenvolvimento *in vitro* de embriões zigóticos de *Coffea arabica* L. cv. Catuaí vermelho (IAC 144) 8 dias após o processo de criopreservação.



Legenda: Efeito do tempo de desidratação (0, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 horas) no desenvolvimento de embriões zigóticos de *Coffea arabica* L. cv. Catuaí vermelho (IAC 144) não imersos em nitrogênio líquido (-LN) ou imersos em nitrogênio líquido (+LN) após 8 dias de cultivo *in vitro*. Barra = 0,5 cm

Fonte: Do autor (2021).

3.2.1.2 Desenvolvimento dos embriões zigóticos após descongelamento

Após 150 dias de cultivo foi demonstrado que o processo de criopreservação, por meio da técnica de *encapsulation-dehydration*, não afetou o desenvolvimento dos embriões zigóticos, tendo em vista que não foram observadas diferenças significativas no comprimento da parte aérea e raiz, número de folhas e peso fresco total das plântulas resultantes dos tempos de 8, 10 e 12 horas de desidratação dos embriões zigóticos, imersos em nitrogênio líquido, quando comparadas aos tratamentos cujos embriões não foram imersos em nitrogênio líquido (Figura 13).

Figura 13 – Crescimento *in vitro* de plântulas de *Coffea arabica* L. cv. Catuaí vermelho (IAC 144) após o processo de criopreservação (Continua).

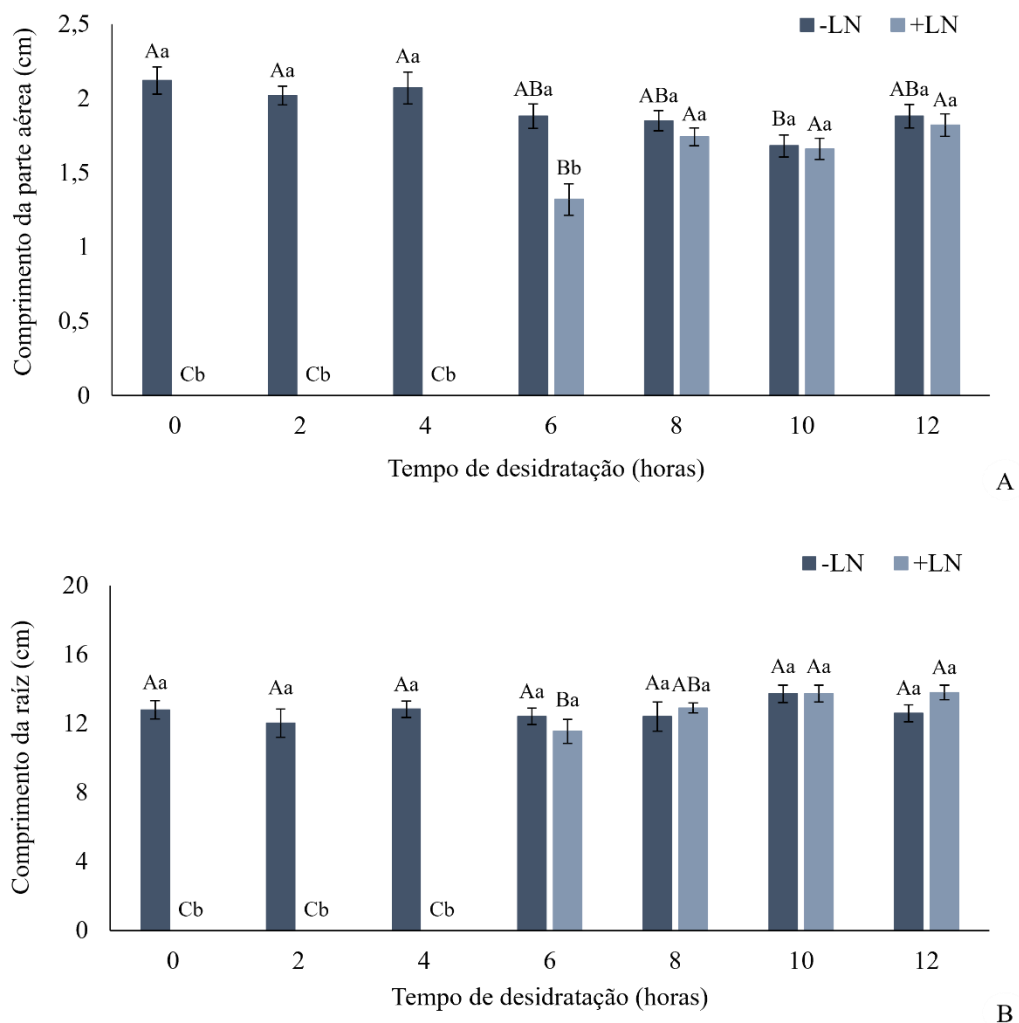
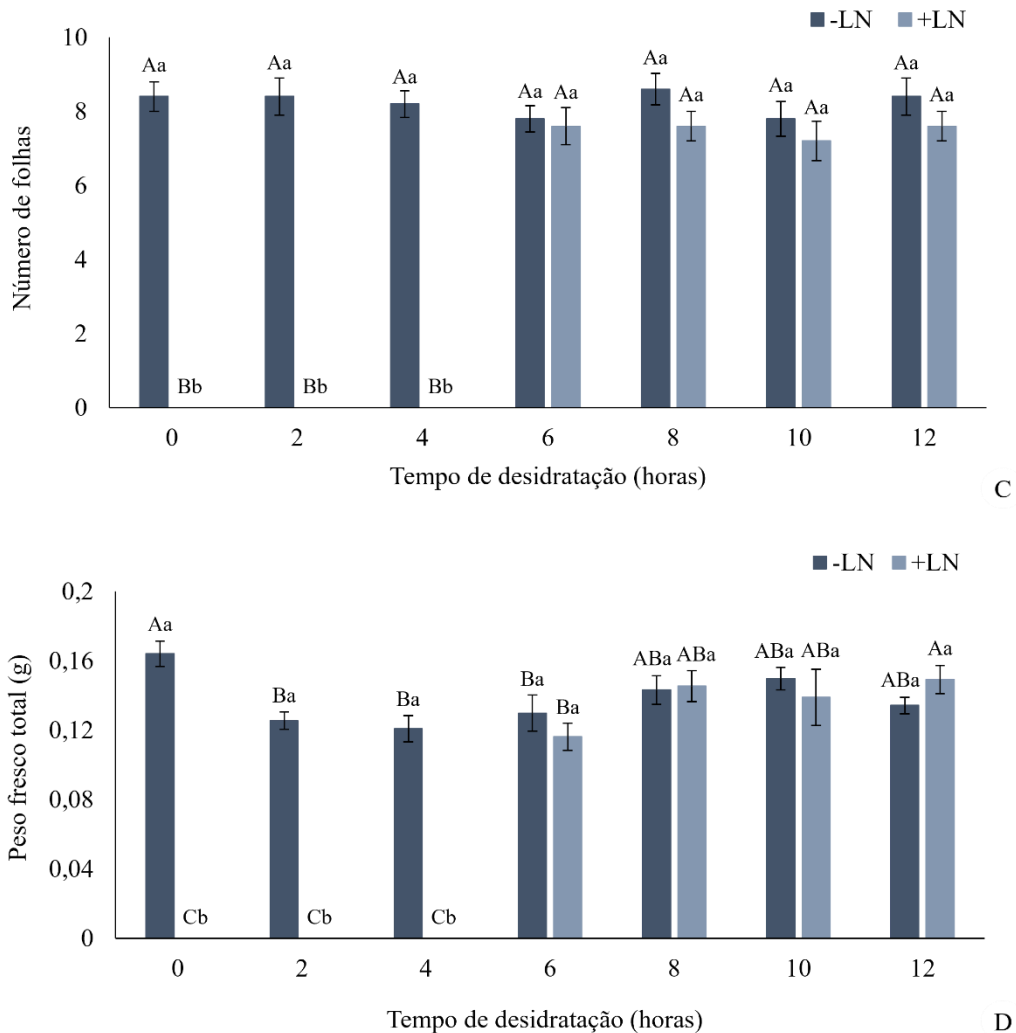


Figura 13 – Crescimento *in vitro* de plântulas de *Coffea arabica* L. cv. Catuaí vermelho (IAC 144) após o processo de criopreservação (Conclusão).



Legenda: Efeito do tempo de desidratação (0, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 horas) de embriões zigóticos de *Coffea arabica* L. cv. Catuaí vermelho (IAC 144) não imersos em nitrogênio líquido (-LN) ou imersos em nitrogênio líquido (+LN) no crescimento da parte aérea (A), raiz (B), número de folhas (C) e peso fresco total (D), após 150 dias de cultivo. Médias seguidas da mesma letra maiúscula (tempo de desidratação) e médias seguidas da mesma letra minúscula (imersas ou não em nitrogênio líquido) não apresentam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

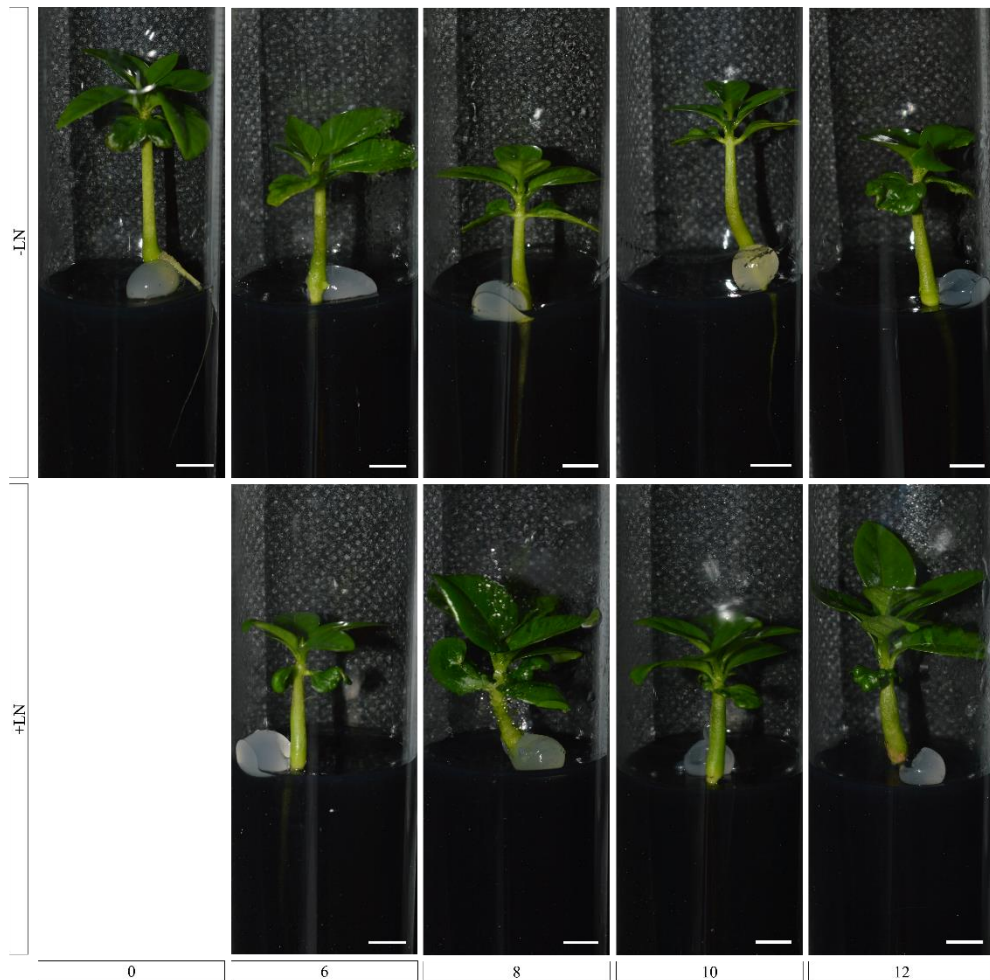
Fonte: Do autor (2021).

No tempo de 6 horas de desidratação as plântulas formadas de embriões zigóticos que foram criopreservados apresentam menor comprimento da parte aérea em relação aos não criopreservados. No entanto não foram observadas diferenças significativas entre estes, quanto ao comprimento da raiz, número de folhas e peso fresco total (Figura 13).

Após 150 dias de cultivo *in vitro*, as plântulas apresentavam uma média de 2 cm de comprimento de parte aérea, 13 cm de comprimento de raiz, 8 folhas e aproximadamente 0,14

g de peso fresco total. As plântulas não apresentavam aspecto vítreo e nem indícios de oxidação e as folhas estavam expandidas sem manchas de necrose (Figura 14).

Figura 14 – Plântulas de embriões zigóticos de *Coffea arabica* L. cv. Catuaí vermelho (IAC 144), 150 dias após o processo de criopreservação.



Legenda: Plântulas de *Coffea arabica* L. cv. Catuaí vermelho (IAC 144), cujos embriões zigóticos não foram imersos em nitrogênio líquido (-LN) ou imersos em nitrogênio líquido (+LN) após 0, 6, 8, 10 e 12 horas de desidratação. Barra = 0,5 cm.

Fonte: Do autor (2021).

3.2.2 Encapsulation-vitrification

Assim como observado para a cultivar IAC-62, os resultados demonstraram que 100% dos embriões zigóticos criopreservados submetidos ao tratamento de *encapsulation-vitrification* não sobreviveram ao processo de congelamento em nitrogênio líquido, independentemente do tempo em PVS2. Em contrapartida 100% dos embriões zigóticos não

criopreservados foram capazes de romper a cápsula e prosseguir o desenvolvimento da parte aérea e raiz.

4 DISCUSSÃO

Um protocolo eficiente para criopreservação de espécies vegetais tem que garantir que as células possam sobreviver e regenerar plântulas saudáveis, idênticas à planta mãe, visto que o objetivo da conservação vegetal é garantir o armazenamento de recursos genéticos para futuras utilizações em programas de melhoramento ou restauração de ambientes degradados.

Nesse contexto, o presente estudo demonstrou que a partir da técnica de *encapsulation-dehydration* é possível criopreservar embriões zigóticos de cultivares de café arábica, considerando que os embriões foram capazes de regenerar após o congelamento em nitrogênio líquido, com crescimento semelhante ao de embriões zigóticos não congelados. Não foram observados atrasos no desenvolvimento dos embriões e as plântulas regeneradas de embriões zigóticos criopreservados apresentaram comprimento, número de folhas e peso fresco total equivalente ao de plântulas cujos embriões zigóticos não foram criopreservados.

Os resultados observados para a cultivar IAC 62 de café arábica foram semelhantes aos resultados relatados na cultivar IAC 144. O que indica que a técnica de *encapsulation-dehydration* pode ser expandida para a criopreservação de outras cultivares de café arábica e, empregada em bancos de germoplasma para conservação de material genético de espécies vegetais, tendo em vista que esta técnica é de fácil execução em comparação a outras técnicas convencionais que envolvem mais etapas e maior manipulação dos explantes.

A técnica de *encapsulation-dehydration* tem sido aplicada para uma ampla variedade de espécies vegetais tanto de climas temperados quanto de climas tropicais, empregando diferentes tipos de explantes (PRUDENTE; SOUZA; PAIVA, 2019), incluindo espécies de interesse econômico como a maçã, utilizando como explante gemas axiais (BETTONI et al., 2018), eixos embriogênicos de citrus (ROHINI et al., 2016), ápices de menta (IBÁÑEZ et al., 2019), discos caulinares de alho (LYNCH et al., 2016), protocornios e gemas apicais de orquídeas (POPOVA et al., 2016), gemas apicais de cana-de-açúcar (RAFIQUE et al., 2016) e suspensão celular embriogênica, embriões somáticos e gemas apicais de videiras (BI et al., 2017).

De acordo com os resultados desse estudo acredita-se que o tempo de desidratação foi o fator chave que garantiu a sobrevivência e regeneração dos explantes. Somente quando o teor de umidade foi reduzido a 17% é que os embriões zigóticos, encapsulados por uma matriz de alginato de sódio com alta concentração de sacarose, foram capazes de regenerar após o

congelamento. A desidratação reduz a quantidade de água livre, o que diminui a formação de cristais de gelo. A formação de cristais de gelo é inevitável em todo o processo de criopreservação, e seu controle e inibição são fundamentais para minimizar os danos causados às células. As lesões causadas pelo gelo podem ocorrer tanto de forma extracelular quanto intracelular durante os processos de congelamento e descongelamento provocando danos mecânicos às células, alterações na pressão osmótica e rompimento de organelas (CHANG; ZHAO, 2021).

O encapsulamento dos explantes em uma matriz de alginato de sódio limita as mudanças de pressão osmótica, reduzindo os estresses químicos e físicos causados pelas etapas de criopreservação e limitam a difusão de sacarose (NAUSCH; BUYEL, 2021). A sacarose regula a forma e retarda o crescimento dos cristais de gelo (ZHANG et al., 2019). Dessa forma a redução do teor de água dos explantes associados à alta concentração de sacarose, resultou em transição vítrea durante o resfriamento rápido em nitrogênio líquido evitando a formação de cristais de gelo que levariam à morte celular (TEIXEIRA; GONZÁLEZ-BENITO; MOLINA-GARCIA, 2014).

O aumento da concentração endógena de prolina também contribuiu para a sobrevivência dos explantes. A prolina atua na eliminação de EROs e outros radicais livres (KAUL; SHARMA; MEHTA, 2008), por meio da pirrolidina, que forma o anel de 5 membros da estrutura da prolina, a pirrolidina apresenta baixo potencial de ionização que extingue o oxigênio singleto, mediante um mecanismo de transferência de carga no qual o oxigênio molecular retorna ao estado tripleto fundamental (MATYSIK et al., 2002). Além de seu papel na eliminação de EROs, a prolina também atua na estabilização de membranas e proteínas (MEENA et al., 2019), formando uma barreira defensiva, impedindo a desnaturação, desdobraimento e agregação, preservando assim a atividade funcional das proteínas (FEDOTOVA; DMITRIEVA, 2016).

Estudos tem demonstrado que a aplicação exógena de prolina tem melhorado significativamente a criopreservação de espécies vegetais (ANTONY et al., 2019; LINEROS et al., 2018). Dessa forma o aumento de prolina endógena observada nesse estudo indica que o papel da prolina na estabilização de membranas e no controle de EROs, mitigou os efeitos do processo de desidratação e congelamento dos embriões zigóticos, o que permitiu o desenvolvimento destes no processo de regeneração.

Em relação a atividade dos antioxidantes enzimáticos, estudos tem relatado que a atividade enzimática pode variar de acordo com a etapa do processo de criopreservação (ANTONY et al., 2019), as enzimas SOD e APX, por exemplo, podem aumentar nas etapas de

desidratação e congelamento, que são etapas mais críticas do processo de criopreservação, mas a atividade pode diminuir nas etapas seguintes e não diferir da atividade do controle, após a regeneração dos explantes (VIANNA et al., 2019). Os dados obtidos nesse estudo demonstraram que não há diferença significativa no teor de MDA, H₂O₂ e na atividade das enzimas APX e CAT entre os embriões zigóticos criopreservados e não criopreservados, no entanto as análises foram realizadas 7 dias após o descongelamento dos explantes, etapa final do processo de criopreservação, dessa forma, acredita-se que se existiu um aumento no teor ou na atividade destes compostos, venho a ocorrer nas etapas anteriores a que realizou-se essa análise (regeneração dos explantes).

Com referência as enzimas SOD e POD, aos 7 dias de cultivo, observou-se diferença estatística na atividade destas entre os embriões zigóticos criopreservados e não criopreservados. Acredita-se que essa diferença possa diminuir gradualmente no decorrer dos dias de cultivo ou até mesmo atingir a equidade em relação ao controle, tendo em vista que não foram observadas diferenças significativas no crescimento das plântulas regeneradas de embriões zigóticos criopreservados ou não criopreservados, ou seja, o processo de criopreservação não provocou efeitos oxidativos que resultassem em danos ou atrasos no desenvolvimento dos embriões zigóticos. Esses indícios corroboram para confirmar o sucesso efetivo da técnica de *encapsulation-dehydration* na criopreservação de embriões zigóticos de café arábica.

Em relação a técnica de *encapsulation vitrification*, os embriões zigóticos não foram capazes de sobreviver ao processo de congelamento, provavelmente o tempo na solução de PVS2 não foi suficiente para permitir a formação do estado vítreo e impedir a formação de cristais de gelo, o que inviabilizou a sobrevivência das células. No entanto, já se tem observado que podem ocorrer efeitos adversos dos crioprotetores utilizados na solução de PVS2 na regeneração dos explantes (VAN DER WALT et al., 2021). Dessa forma como a técnica de *encapsulation-dehydration* não se baseia na utilização de crioprotetores, facilita a manipulação de explantes, devido ao material estar encasulado, evitando danos decorrentes do manuseio, além de ser um método fácil de ser executado, associado ao fato de ter permitido a criopreservação de embriões zigóticos de cultivares de café arábica torna-se a ferramenta mais adequada para a conservação a longo prazo para essa espécie.

Nesse estudo constatou-se que por meio da técnica de *encapsulation-dehydration* é possível criopreservar embriões zigóticos de café arábica. O protocolo estabelecido tanto para a cultivar IAC-62 quanto para a cultivar IAC-144, indica que essa técnica pode ser expandida para outras cultivares e ser utilizada com sucesso em bancos de germoplasma para conservação

a longo prazo dessa cultura extremamente importante para a economia mundial, tendo em vista que as mudanças climáticas pertencem a uma realidade não tão distante que pode afetar o cultivo de espécies comerciais, sendo importante manter os genótipos armazenados para futuros trabalhos de melhoramento genético e restauração de ecossistemas.

5 CONCLUSÃO

Ao final do exposto conclui-se, portanto, que é possível criopreservar com eficiência embriões zigóticos de *Coffea arabica* cultivares Catuaí amarelo e Catuaí vermelho utilizando a técnica de *encapsulation-dehydration* e recomenda-se a desidratação dos explantes por 8 horas em câmara de fluxo laminar.

O aumento do conteúdo de prolina em embriões criopreservados pode ter contribuído para a sobrevivência dos explantes ao processo de congelamento.

REFERÊNCIAS

- ANTONY, J. J. J.; ZAKARIA, S.; ZAKARIA, R.; UJANG, J. A.; OTHMAN, N.; SUBRAMANIAM, S. Biochemical analyses of *Dendrobium* Sabin Blue PLBs during cryopreservation by vitrification. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 25, p. 1457-1467, 2019.
- BI, W. L.; PAN, C.; HAO, X. Y.; CUI, Z. H.; KHER, M. M.; MARKOVIĆ, Z.; WANG, Q. C.; TEIXEIRA da SILVA, J. A. Cryopreservation of grapevine (*Vitis* spp.) — A review. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 53, n. 5, p. 449-460, 2017.
- BIEMELT, S.; KEETMAN, U.; ALBRECHT, G. Re-aeration following hypoxia or anoxia leads to activation of the antioxidative defense system in roots of wheat seedlings. **Plant Physiology**, v. 116, n. 2, p. 651-658, 1998.
- BETTONI, J. C.; DALLA COSTA, M.; SOUZA, J. A.; VOLK, G. M.; NICKEL, O.; SILVA, F. N.; KRETZSCHMAR, A. A. Cryotherapy by encapsulation-dehydration is effective for *in vitro* eradication of latent viroses from ‘Marubakaido’ apple rootstock. **Journal of Biotechnology**, v. 269, p. 1-7, 2018.
- BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. In: **Methods in Enzymology**. Academic press, 1978. p. 302-310.
- COELHO, N.; GONÇALVES, S.; ROMANO, A. Endemic plant species conservation: Biotechnological approaches. **Plants**, v. 9, n. 3, p. 345, 2020.
- CHANG, T.; ZHAO, G. Ice inhibition for cryopreservation: Materials, strategies, and challenges. **Advanced Science**, v. 8, n. 2002425, p. 1-34, 2021.
- CIRINGER, T.; MARTÍN, C.; ŠAJNA, N.; KALIGARIČ, M.; AMBROŽIČ-DOLINŠEK, J. Cryopreservation of an endangered *Hladnikia pastinacifolia* Rechb. by shoot tip encapsulation-dehydration and encapsulation-vitrification. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 54, n. 6, p. 565-575, 2018.
- ENGELMANN, F.; ARNAO, M. T. G.; WU, Y.; ESCOBAR, R. Development of encapsulation dehydration. In: REED B. M. (eds). **Plant Cryopreservation: A Practical Guide**. Springer, New York, 2008. p 59-75.
- FEDOTOVA, M.V.; DMITRIEVA, O. A. Proline hydration at low temperatures: Its role in the protection of cell from freeze-induced stress. **Amino Acids**, v. 48, p. 1685-1694, 2016.
- GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. **Plant physiology**, v. 59, n. 2, p. 309-314, 1977.
- GONZALEZ-ARNAO, M. T.; ENGELMANN, F. Cryopreservation of plant germplasm using the encapsulation-dehydration technique: Review and case study on sugarcane. **CryoLetters**, v. 27, n. 3, p. 155-168, 2006.

GONZÁLEZ-BENITO, M. E.; RAMÍREZ, I. C.; ARANDA, J. M. L. The use of cryopreservation for germplasm conservation of vegetatively propagated crops. **Spanish Journal of Agricultural Research**, n. 3, p. 341-352, 2004.

HAVIR, E. A.; MCHALE, N. A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, v. 84, n. 2, p. 450-455, 1987.

IBÁÑEZ, M. A.; ALVAREZ-MARI, A.; RODRÍGUEZ-SANZ, H.; KREMER, C.; GONZÁLEZ-BENITO, M. E.; MARTÍN, C. Genetic and epigenetic stability of recovered mint apices after several steps of a cryopreservation protocol by encapsulation-dehydration. A new approach for epigenetic analysis. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 143, p. 299-307, 2019.

ICO – International Coffee Organization (2021). **Historical Data on the Global Coffee Trade**. Disponível em: < https://www.ico.org/new_historical.asp > Acessado em: Dezembro de 2021.

KAUL, S.; SHARMA, S. S.; MEHTA, I. K. Free radical scavenging potential of L-proline: Evidence from *in vitro* assays. **Amino acids**, v. 34, n. 2, p. 315-320, 2008.

LYNCH, P. T.; SOUCH, G. R.; ZÁMENÍK, J.; HARDING, K. Optimization of water content for the cryopreservation of *Allium sativum in vitro* cultures by encapsulation-dehydration. **CryoLetters**, v. 37, n. 5, p. 308-317, 2016.

LINEROS, Y.; BALOCCHI, C.; MUÑOZ, X.; SANCHEZ, M.; RÍOS, D. Cryopreservation of *Pinus radiata* embryogenic tissue: Effects of cryoprotective pretreatments on maturation ability. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 135, p. 357-366, 2018.

MATSUMOTO, T.; SAKAI, A.; YAMADA, K. Cryopreservation of *in vitro* grown apical meristems of wasabi (*Wasabia japonica*) by vitrification and subsequent high plant regeneration. **Plant Cell Reports**, v. 13, n. 8, p. 442-446, 1994.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, v. 22, n. 5, p. 867-880, 1981.

NAUSCH, H.; BUYEL, J. F. Cryopreservation of plant cell cultures–Diverse practices and protocols. **New Biotechnology**, v. 62, p. 86-95, 2021.

O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; MCCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, v. 59, n. 2, p. 368-373, 1964.

PANIS, B.; NAGEL, M.; VAN DEN HOUWE, I. Challenges and prospects for the conservation of crop genetic resources in field genebanks, in *in vitro* collections and/or in liquid nitrogen. **Plants**, v. 9, n. 12, p. 1634, 2020.

- POPOVA, E.; KIM, H. H.; SAXENA, P. K.; ENGELMANN, F.; PRITCHARD, H. W. Frozen beauty: The cryobiotechnology of orchid diversity. **Biotechnology Advances**, v. 34, n. 4, p. 380-403, 2016.
- PRUDENTE, D. de O. SOUZA, L. B. de; PAIVA, R. Synthetic Seeds: Prospects and Advances in Cryopreservation. In: **Synthetic Seeds**. Springer, Cham, 2019. p. 417-437.
- RAFIQUE, T.; YAMAMOTO, S. I.; FUKUI, K.; TANAKA, D.; ARIZAGA, M. V.; ABBAS, M.; MATSUMOTO, T.; NIINO, T. Cryopreservation of shoot-tips from different sugarcane varieties using D cryo-plate technique. **Pakistan Journal of Agricultural Sciences**, v. 53, n. 1, p. 151-158, 2016.
- ROHINI, M. R.; MALIK, S. K.; CHOUDHARY, R.; KAUR, S.; UCHOI, A.; CHAUDHURY, R. Storage behavior and cryopreservation studies in Indian rough lemon (*Citrus jambhiri*): A promising rootstock for long-term conservation. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**. v. 40, p. 865-873, 2016.
- REN, R.; LI, Z.; ZHANG, L.; ZHOU, H.; JIANG, X.; LIU, Y. Enzymatic and nonenzymatic antioxidant systems impact the viability of cryopreserved *Paeonia suffruticosa* pollen. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 144, n. 1, p. 233-246, 2021.
- RUTA, C.; LAMBARDI, M.; OZUDOGRU, E. A. Biobanking of vegetable genetic resources by *in vitro* conservation and cryopreservation. **Biodiversity and Conservation**, v. 29, p. 3495–3532, 2020.
- SAKAI, A.; KOBAYASHI, S.; OIYAMA, I. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. **Plant Cell Reports**, v. 9, p. 30-33, 1990.
- SHARMA, S.; SHAHZAD, A.; DA SILVA, J. A. T. Synseed technology—A complete synthesis. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 2, p. 186-207, 2013.
- TAVARES, P. S.; GIAROLLA, A.; CHOU, S. C.; SILVA, A. J. P.; LYRA, A. A. Climate change impact on the potential yield of Arabica coffee in southeast Brazil. **Regional Environmental Change**, v. 18, p. 873–883, 2018.
- TEIXEIRA, A. S.; GONZÁLEZ-BENITO, M. E.; MOLINA-GARCÍA, A. D. Determination of glassy state by cryo-SEM and DSC in cryopreservation of mint shoot tips by encapsulation–dehydration. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 119, p. 269-280, 2014.
- VAN DER WALT, K.; KEMP, P.; SOFKOVA-BOBCHEVA, S.; BURRITT, D.; NADARAJAN, J. Evaluation of droplet-vitrification, vacuum infiltration vitrification and encapsulation-dehydration for the cryopreservation of *Syzygium mairé* zygotic embryos. **Cryoletters**, v. 42, n. 4, p. 202-209, 2021.
- VAN DER VOSSSEN, H.; BERTRAND, B.; CHARRIER, A. Next generation variety development for sustainable production of arabica coffee (*Coffea arabica* L.): A review. **Euphytica** v. 204, p. 243–256, 2015.

VELIKOVA, V.; YORDANOV, I.; EDREVA, A. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: Protective role of exogenous polyamines. **Plant Science**, v. 151, p. 59-66, 2000.

VIANNA, M. G.; GARCIA, R. O.; MANSUR, E.; ENGELMANN, F.; PACHECO, G. Oxidative stress during the cryopreservation of *Passiflora suberosa* L. shoot tips using the V-Cryo-plate technique: Determination of the critical stages of the protocol. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 139, p. 369-379, 2019.

ZHANG, M.; GAO, C.; YE, B.; TANG, J.; JIANG, B. Effects of four disaccharides on nucleation and growth of ice crystals in concentrated glycerol aqueous solution. **Cryobiology**, v. 86, p. 47-51, 2019.

CAPÍTULO 3
ACLI MATI Z A Ç Ã O EM SISTEMA HIDROPÔNICO DE PLÂNTULAS
DE *Coffea arabica* L. ORIGINADAS DE EMBRIÕES ZIGÓTI COS
CRIOPRESERVADOS

RESUMO

No contexto das mudanças climáticas, cujas projeções demonstram alterações nas áreas de plantio devido a variações na precipitação anual, temperatura média e aumento na concentração de CO₂, a conservação de recursos genéticos é uma estratégia importante para garantir a disponibilidade de material para programas de melhoramento genético de plantas e restauração de ecossistemas. Por meio de técnicas de criopreservação é possível conservar uma gama de espécies de interesse comercial, como o café, uma cultura importante para a economia mundial. Os embriões zigóticos de cultivares de *Coffea arabica* (IAC 62 e IAC 144) podem ser criopreservados pela técnica de *encapsulation-dehydration* ao submeter os explantes a desidratação por 8 horas. Para comprovar a efetividade da criopreservação do material genético é importante que as plântulas regeneradas *in vitro* possam ser reintroduzidas ao ambiente *ex vitro*. Essa etapa consiste na fase de aclimatização que, por meio de condições específicas permite que as plântulas possam crescer e se desenvolver tornando-se aptas para a transferência para o campo, no entanto, é um processo delicado, pois as plântulas regeneradas *in vitro* podem não sobreviver quando transferidas para o ambiente *ex vitro*. Diante do exposto o objetivo desse estudo foi estabelecer um protocolo para a aclimatização de plântulas regeneradas de embriões zigóticos criopreservados de cultivares de *Coffea arabica*, utilizando o sistema hidropônico com substrato. Para iniciar esse processo as plântulas regeneradas *in vitro* foram retiradas dos tubos de ensaio e transferidas para tubetes acondicionados em piscinas de material sintético, estruturadas em casa de vegetação. As piscinas recebiam solução nutritiva por meio de um sistema fechado. Ao final do período de aclimatização foram realizadas avaliações quanto ao comprimento da parte aérea e raiz, número de folhas, área foliar e peso fresco e seco. As plantas aclimatizadas originadas de embriões zigóticos que foram criopreservados atingiram as mesmas características morfológicas de plantas cujos embriões não foram criopreservados. Dessa forma conclui-se que é possível aclimatizar plantas oriundas de embriões zigóticos criopreservados de cultivares de café arábica por meio do sistema hidropônico com substrato.

Palavras-chave: Semi-Hidroponia. Criopreservação. Conservação *in vitro*. Catuaí.

ABSTRACT

In the context of climate change, whose projections show changes in planting areas due to variations in annual precipitation, average temperature and increase in CO₂ concentration, the conservation of genetic resources is an important strategy to guarantee the availability of material for genetic improvement programs. of plants and restoration of ecosystems. Through cryopreservation techniques it is possible to conserve a range of species of commercial interest, such as coffee, an important crop for the world economy. The zygotic embryos of *Coffea arabica* cultivars (IAC 62 and IAC 144) can be cryopreserved by the encapsulation-dehydration technique by subjecting the explants to dehydration for 8 hours. To prove the effectiveness of the cryopreservation of genetic material, it is important that the seedlings regenerated *in vitro* can be reintroduced to the *ex vitro* environment. This step consists of the acclimatization phase that, through specific conditions, allows the seedlings to grow and develop, becoming ready for transfer to the field, however, it is a delicate process, as the seedlings regenerated *in vitro* may not survive when transferred to the *ex vitro* environment. In view of the above, the objective of this study was to establish a protocol for the acclimatization of regenerated seedlings from cryopreserved zygotic embryos of *Coffea arabica* cultivars, using the hydroponic system with substrate. To start this process, the seedlings regenerated *in vitro* were removed from the test tubes and transferred to tubes packed in pools of synthetic material, structured in a greenhouse. The pools received nutrient solution through a closed system. At the end of the acclimatization period, evaluations were performed regarding shoot and root length, number of leaves, leaf area and fresh and dry weight. Acclimatized plants originated from zygotic embryos that were cryopreserved reached the same morphological characteristics of plants whose embryos were not cryopreserved. Thus, it is concluded that it is possible to acclimatize plants from cryopreserved zygotic embryos of arabica coffee cultivars through the hydroponic system with substrate.

Keywords: Semi-Hydroponics. cryopreservation. *In vitro* conservation. Catuaí.

1 INTRODUÇÃO

No contexto das mudanças climáticas, conservar os recursos genéticos do café arábica, constitui uma importante fonte mantenedora de diversidade genética para os futuros programas de melhoramento genético, frente os desafios de um sistema de produção agrícola que pode ser duramente afetado pelas mudanças de temperatura e regime hídrico (FAWZY et al., 2020).

A conservação do material genético do café arábica pode ser realizada por meio da criopreservação de embriões zigóticos, utilizando a técnica de *encapsulation-dehydration*. No entanto, após a regeneração dos explantes criopreservados é preciso que as plântulas regeneradas *in vitro* sejam capazes de sobreviver em um ambiente *ex vitro*. Esse processo de transferência de plântulas cultivadas *in vitro* para o ambiente *ex vitro* é denominado de aclimatização (HAZARIKA, 2003).

Em decorrência do ambiente controlado de cultivo *in vitro*, as plântulas regeneradas apresentam características fisiológicas e morfológicas distintas, quando comparadas as plântulas cultivadas *ex vitro*, de forma que é a partir do processo de aclimatização que as plântulas irão adquirir características que permitirão seu estabelecimento em campo, como a emissão de novas folhas que apresentam maior espessura, desenvolvimento de cutícula e ceras epicuticulares, diferenciação do mesofilo em parênquima paliádico e esponjoso, presença de estômatos funcionais, dentre outras (CHANDRA et al., 2010).

Dentre as técnicas de aclimatização que visam garantir a sobrevivência das plântulas quando transferidas para o ambiente *ex vitro*, o cultivo em sistema hidropônico vem recebendo destaque (HOANG et al., 2019; CASTAÑEDA-MÉNDEZ et al., 2017). A hidroponia é uma técnica de cultivo de culturas em soluções nutritivas com ou sem o uso de um meio sólido inerte (cascalho, vermiculita, lã de rocha, turfa, serragem, pó ou fibra de coco) para fornecer suporte mecânico (SHARMA et al., 2018). Atualmente a hidroponia tem sido considerada o futuro da sustentabilidade alimentar global complementando outros sistemas de cultivo no fornecimento de alimentos (TREFTZ; OMAYE, 2016). Essa técnica tem um potencial significativo para contribuir com a produção de alimentos para atender às necessidades de uma população em ascensão por ser um sistema que otimiza o uso do espaço e do tempo e permitir o uso eficiente de insumos agrícolas em comparação com o sistema de cultivo convencional (SHARMA et al., 2018; ALSHROUF, 2017).

A utilização do cultivo hidropônico como técnica para a aclimatização de plântulas de café arábica ainda não foi citada na literatura e tendo em vista as vantagens dessa tecnologia na agricultura, inclusive para a produção de mudas de café arábica (LIMA et al., 2021), o objetivo

desse estudo foi estender o uso da hidroponia com substrato para aclimatização de plântulas de cultivares de café arábica, após a criopreservação de embriões zigóticos a fim de finalizar o protocolo de criopreservação, garantindo a efetividade da técnica de *encapsulation-dehydration* para a conservação dessa cultura economicamente importante para a economia mundial.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas do setor de Fisiologia Vegetal, do Departamento de Biologia, da Universidade Federal de Lavras em colaboração com o Horto Botânico, do Departamento de Agricultura, da Universidade Federal de Lavras (UFLA). As sementes de *Coffea arabica* L. cultivares Catuaí amarelo (IAC 62) e Catuaí vermelho (IAC 144) foram obtidas beneficiadas a partir de lavouras da Fazenda experimental da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG).

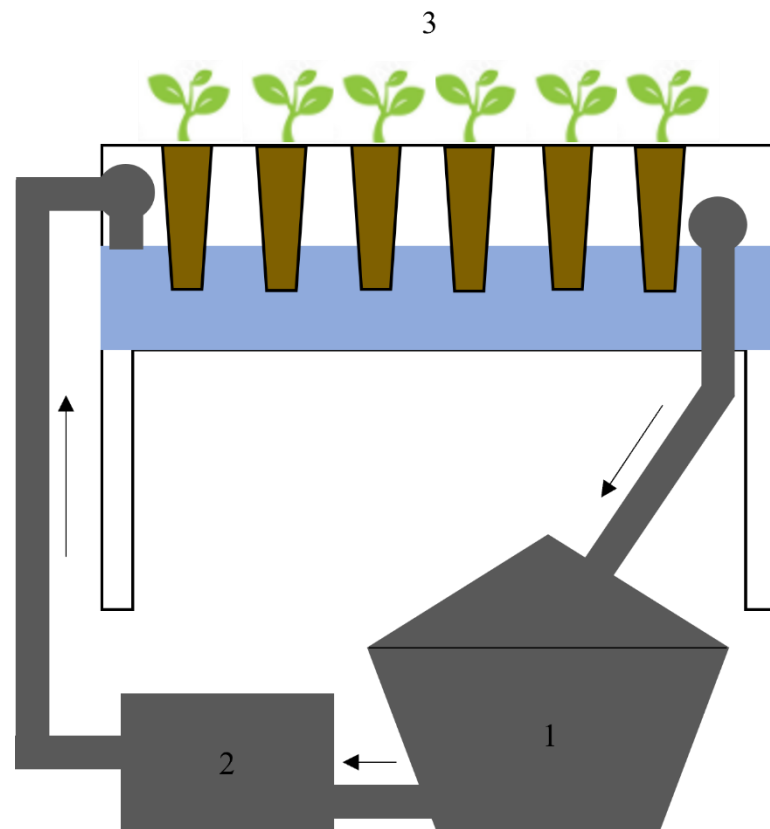
Para a desinfestação, após a retirada manual do endocarpo (pergaminho), as sementes foram imersas em uma solução de formaldeído (1,5%) por 30 minutos sob agitação constante de 150 rpm a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Foram utilizados 2 mL da solução por semente (FREITAS et al., 2016). Posteriormente, as sementes foram lavadas três vezes em água destilada e autoclavada, e em seguida, foram imersas em solução de ácido bórico 0,5% (p/v), permanecendo nessa solução por 72 horas sob agitação constante de 150 rpm a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ (FREITAS et al., 2016). Após esse período, em câmara de fluxo laminar, as sementes foram lavadas três vezes em água destilada e autoclavada e os embriões zigóticos foram extraídos.

Os embriões zigóticos foram inoculados em meio de cultivo MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado por 30 g L^{-1} de sacarose, $1,5 \text{ g L}^{-1}$ de carvão ativado e solidificado por $2,5 \text{ g L}^{-1}$ de phytigel[®]. O pH do meio de cultivo foi ajustado para $5,8 \pm 0,1$ e submetido à esterilização em autoclave a temperatura de 121°C e 1 atm de pressão por 20 minutos. Após a inoculação dos embriões zigóticos em meio de cultivo, as culturas permaneceram por 6 dias no escuro e posteriormente foram transferidas para salas de crescimento em condições de fotoperíodo de 16 horas e temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, com irradiância no topo dos recipientes de cultura fornecidos por lâmpadas de LED branca (9 W).

2.2 Substrato para aclimatização em sistema hidropônico

Plantas oriundas do desenvolvimento de embriões zigóticos *Coffea arabica* L. cvs. Catuaí Vermelho (IAC 144) e Catuaí amarelo (IAC 62), cultivadas *in vitro* por 150 dias foram transferidas para tubetes contendo 3 tipos de substrato (vermiculita, fibra de coco e cascas de arroz carbonizado). Os tubetes foram posicionados em grades para tubetes e estas foram dispostas em uma “piscina” de material sintético, com dimensões de 3,20m x 0,60m x 0,30m, niveladas sobre bancadas de alvenaria, estruturadas em uma casa de vegetação com cobertura de filme de polietileno dupla face. As ‘piscinas’ foram cobertas com filme de polietileno branco, com abertura para posicionamento dos tubetes a fim de evitar a entrada de luz e a proliferação de algas na solução nutritiva. As ‘piscinas’ possuíam um sistema fechado de circulação da solução nutritiva, onde o tanque recebia a solução nutritiva (FAQUIN; CHALFUN, 2008), oriunda de um reservatório com capacidade para 1000 litros. A solução circulava nas ‘piscinas’ pelo conjunto de motor-bomba (3 vezes ao dia) pelo acionamento de um temporizador conforme exemplificado na Figura 1. A cada 30 dias a solução nutritiva era renovada.

Figura 1- Sistema hidropônico



Legenda: Esquema do sistema hidropônico: (1) reservatório de solução nutritiva; (2) motobomba e (3) caixa rasa nivelada, denominada piscina, dimensionada para que os suportes contendo as mudas se encaixem em sua estrutura.

Fonte: Adaptado de Faquin e Chaulfun (2008).

Após 150 dias de cultivo foram realizadas avaliações quanto ao comprimento da parte aérea e raiz (cm), número de folhas e peso fresco (g), a fim de obter o melhor tipo de substrato para a aclimatização de plântulas de café cultivadas *in vitro*.

2.3 Aclimatização de plântulas regeneradas de embriões zigóticos criopreservados

Tendo em vista que os embriões zigóticos de *Coffea arabica* cultivares Catuaí amarelo e Catuaí vermelho podem ser criopreservados utilizando a técnica de *encapsulation-dehydration* por meio da desidratação dos explantes a partir de 8 horas em câmara de fluxo laminar. As plântulas regeneradas *in vitro* de embriões zigóticos que foram desidratados por 8, 10 e 12 horas e imersos em nitrogênio líquido, juntamente com os correspondentes não imersos em nitrogênio líquido e controle (não criopreservado) após 150 dias de cultivo *in vitro*, foram transferidas para tubetes contendo o melhor tipo de substrato para aclimatização de café arábica, conforme resultados do item anterior. Os tubetes foram dispostos em um sistema semi-hidropônico para aclimatização das plântulas.

As plantas foram cultivadas em casa de vegetação de estrutura metálica com cobertura plástica transparente e camada de sombrite 50% sob a cobertura, não possuía sistema de irrigação por nebulização, nem controle de temperatura com ventiladores.

Ao final de 180 dias de aclimatização foram realizadas avaliações quanto à sobrevivência das mudas e análises de crescimento quanto ao comprimento da parte aérea e raízes (cm), número de folhas, área foliar (por meio do *software Easy Leaf Area*) e peso fresco e seco (g).

2.4 Delineamento experimental

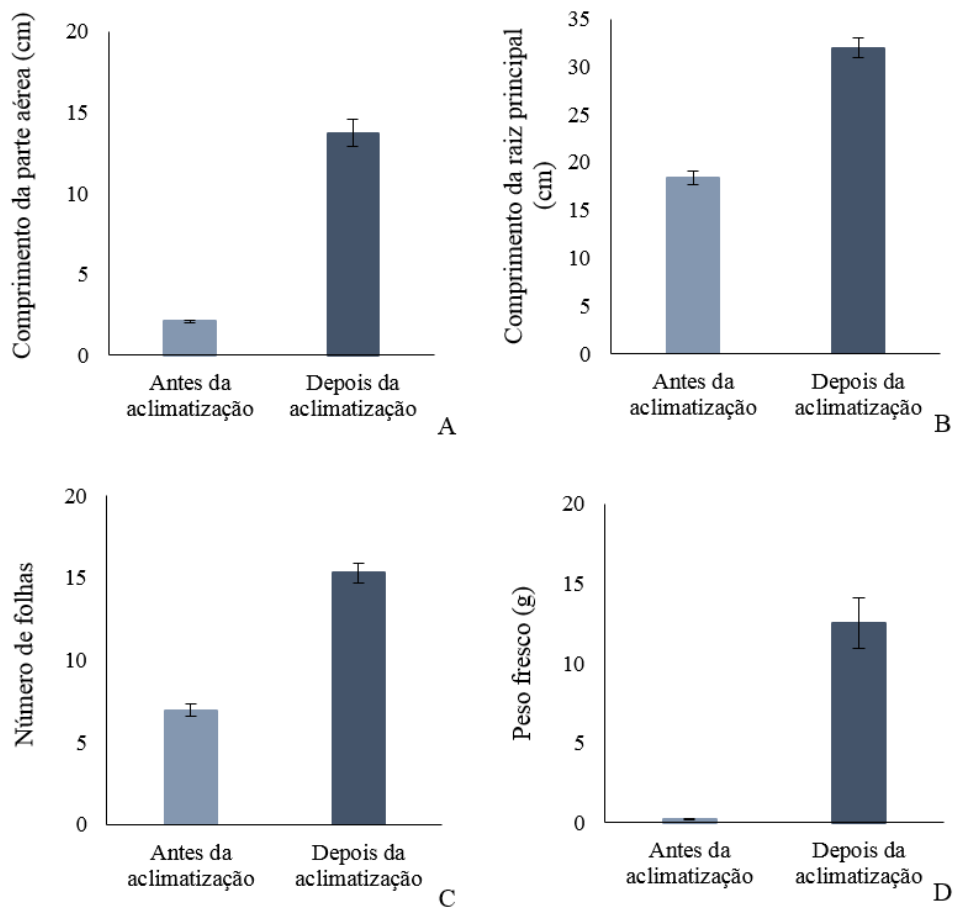
Os experimentos foram conduzidos em Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) com quinze repetições por tratamento. Os dados obtidos foram submetidos à análise da variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% ($P < 0,05$). Os cálculos foram realizados com auxílio do software Sisvar (Ferreira, 2014).

3 RESULTADOS

3.1 Substrato para aclimatização em sistema hidropônico

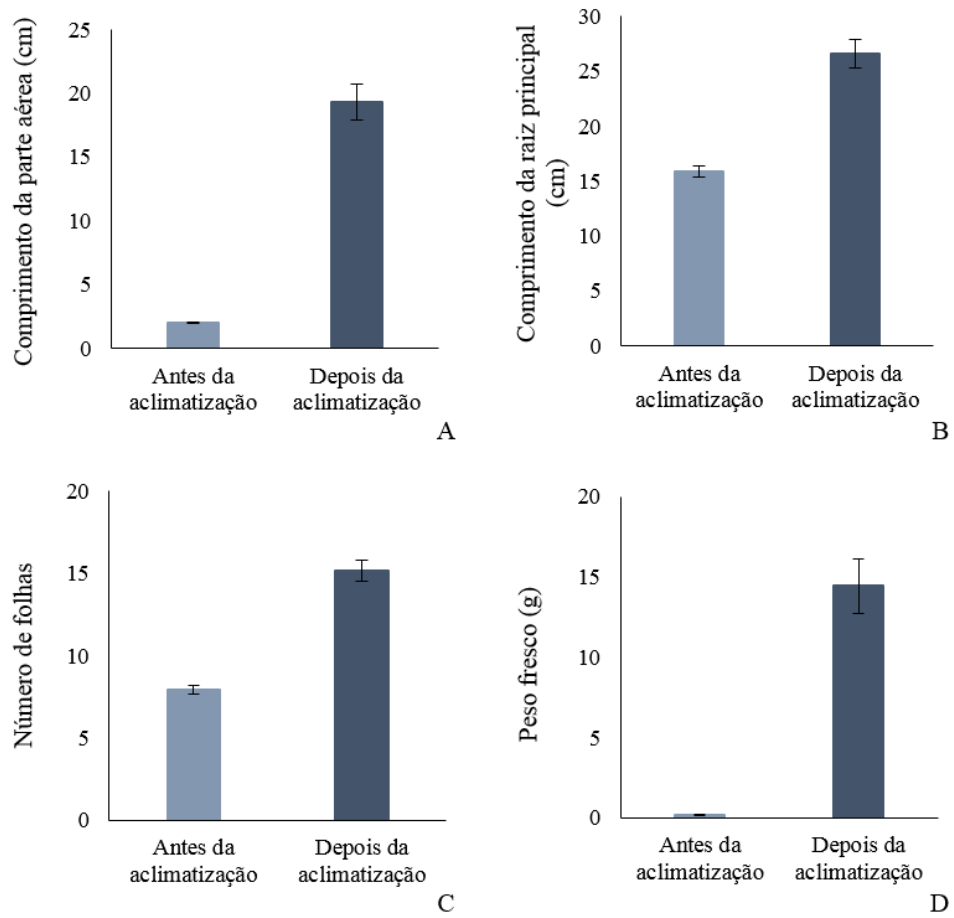
Com os resultados obtidos foi observado que a vermiculita é o melhor substrato para aclimatização de plântulas de café cultivadas *in vitro* por meio do desenvolvimento de embriões zigóticos, tanto para a cultivar IAC 62, quanto para a cultivar IAC 144, tendo em vista que nenhuma planta sobreviveu nos substratos fibra de coco e casca de arroz carbonizado. Em relação ao substrato vermiculita, todas as plântulas aclimatizadas sobreviveram e apresentaram aumento na parte aérea, raiz, número de folhas e peso fresco (Figuras 2, 3).

Figura 2 – Crescimento de plântulas aclimatizadas de *Coffea arabica* L. cv. Catuaí amarelo.



Legenda: Crescimento de plântulas de *Coffea arabica* L. cv. Catuaí amarelo, IAC 62, antes e após 150 dias de aclimatização em sistema semi-hidropônico.

Fonte: Do autor (2021).

Figura 3 – Crescimento de plântulas aclimatizadas de *Coffea arabica* L. cv. Catuaí vermelho.

Legenda: Crescimento de plântulas de *Coffea arabica* L. cv. Catuaí vermelho, IAC 144, antes e após 150 dias de aclimatização em sistema semi-hidropônico.

Fonte: Do autor (2021).

Figura 4 – Mudanças aclimatizadas de cultivares *Coffea arabica* L.



Legenda: Mudanças de *Coffea arabica* L. cvs. Catuaí Vermelho, IAC 144 (A) e Catuaí amarelo, IAC 62 (B). Barra = 5 cm.

Fonte: Do autor (2021).

3.2 Aclimatização de plântulas regeneradas de embriões zigóticos criopreservados

3.2.1 *Coffea arabica* L. cv. Catuaí amarelo

Ao final do processo de regeneração dos embriões zigóticos criopreservados e tendo observado que os melhores tratamentos foram resultantes a partir de 8 horas de desidratação. Plântulas dos tratamentos de 8, 10 e 12 horas de desidratação imersas ou não imersas em nitrogênio líquido, juntamente com o tratamento controle (não desidratado e não criopreservado) foram selecionadas para o processo de aclimatização em sistema semi-hidropônico, utilizando como substrato a vermiculita.

Durante o período de cultivo (aclimatização), a temperatura média variou de cerca de 15 °C - 24 °C, atingindo temperaturas mínima de até 8 °C e máxima de até 33 °C, com a umidade relativa do ar variando de 53 – 79%, conforme exemplificado na Tabela 1.

Tabela 1 – Dados Meteorológicos do município de Lavras- MG

| Semanas de cultivo | Temperatura máxima, diária(°c) | Temperatura média compensada, diária(°c) | Temperatura mínima, diária(°c) | Umidade relativa do ar, média diária(%) |
|--------------------|--------------------------------|------------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------------|
| 1 | 27,57 | 20,25 | 14,20 | 62,57 |
| 2 | 27,21 | 19,39 | 14,11 | 68,93 |
| 3 | 27,04 | 19,89 | 14,97 | 66,57 |
| 4 | 27,21 | 19,27 | 13,70 | 65,25 |
| 5 | 24,49 | 17,99 | 13,40 | 73,29 |
| 6 | 27,01 | 18,33 | 12,64 | 68,21 |
| 7 | 27,21 | 19,51 | 14,24 | 73,00 |
| 8 | 25,31 | 18,72 | 14,91 | 78,75 |
| 9 | 24,91 | 18,74 | 14,80 | 77,14 |
| 10 | 24,20 | 16,68 | 12,07 | 70,57 |
| 11 | 24,44 | 17,32 | 12,46 | 74,82 |
| 12 | 23,17 | 14,98 | 9,39 | 68,68 |
| 13 | 23,16 | 15,24 | 9,67 | 64,75 |
| 14 | 25,91 | 17,65 | 11,13 | 61,71 |
| 15 | 24,86 | 15,95 | 9,41 | 57,68 |
| 16 | 23,66 | 15,04 | 8,36 | 58,18 |
| 17 | 24,07 | 16,36 | 10,89 | 62,50 |
| 18 | 27,69 | 18,97 | 12,31 | 61,36 |
| 19 | 29,63 | 20,52 | 13,61 | 57,61 |
| 20 | 30,09 | 21,21 | 13,87 | 53,18 |
| 21 | 27,43 | 19,86 | 14,17 | 60,93 |
| 22 | 33,13 | 24,37 | 17,39 | 54,71 |
| 23 | 32,74 | 24,40 | 17,87 | 57,39 |
| 24 | 31,96 | 22,63 | 16,04 | 54,86 |
| 25 | 32,77 | 23,26 | 16,89 | 61,38 |
| 26 | 28,83 | 21,89 | 18,07 | null |
| 27 | 27,00 | 20,72 | 16,70 | 73,67 |
| 28 | 26,31 | 19,81 | 16,01 | 75,86 |

Legenda: Dados Meteorológicos fornecidos pelo Instituto Nacional de Meteorologia (INMET). Os dados correspondem à média semanal durante o período de aclimatização de plântulas de cultivares de *Coffea arabica* L. durante o período de cultivo.

Fonte: INMET (2021).

Decorridos 180 dias de cultivo, observou-se que ao final do processo de aclimatização em sistema semi-hidropônico utilizando a vermiculita como substrato, 80% das plântulas sobreviveram ao processo, independentemente do tempo de desidratação dos embriões zigóticos encapsulados e da imersão em nitrogênio líquido.

O comprimento da parte aérea e da maior raiz, formação de novas folhas, área foliar, peso fresco e seco da parte aérea e sistema radicular das plantas não foram afetados pelo processo de criopreservação dos embriões zigóticos e nem pelo tempo de desidratação dos

explantes, tendo em vista que não foram observadas diferenças significativas quanto as variáveis analisadas entre os tratamentos de criopreservação e o controle.

Aos 180 dias as plantas apresentavam cerca de 11 cm de parte aérea, 12 folhas, área foliar de aproximadamente 254 cm², a maior raiz apresentava 14 cm de comprimento, o peso fresco e seco da parte aérea correspondeu à 7 e 1,7 g respectivamente e o peso fresco e seco do sistema radicular à 1,5 e 0,3 g respectivamente. As plantas não apresentavam anormalidades quanto a formação de parte aérea e raízes (Figura 5).

Figura 5 – Mudanças aclimatizadas de *Coffea arabica* L. cv. Catuaí amarelo (IAC 62) após o processo de Criopreservação.



Legenda: Mudanças aclimatizadas, em referência aos tempos de desidratação (0, 8, 10 e 12 horas), de embriões zigóticos de *Coffea arabica* L. cv. Catuaí amarelo (IAC 62) não imersos em nitrogênio líquido (-LN) ou imersos em nitrogênio líquido (+LN). Barra = 2 cm.

Fonte: Do autor (2021).

3.2.2 *Coffea arabica* L. cv. Catuaí vermelho

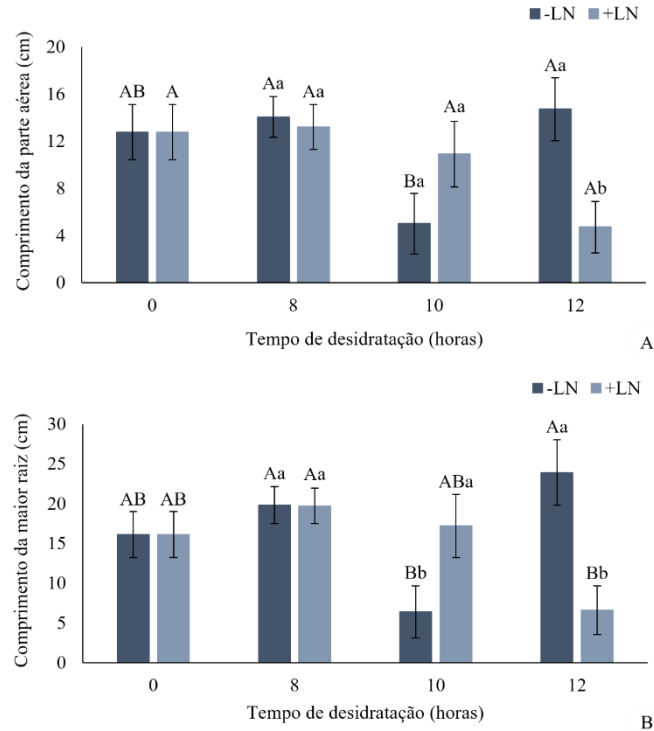
Durante o período de cultivo (aclimatização), a temperatura média variou de cerca de 15 °C - 24 °C, atingindo temperaturas mínima de até 8 °C e máxima de até 33 °C, com a umidade relativa do ar variando de 53 – 79%, conforme exemplificado na Tabela 1.

Assim como observado para a cultivar IAC 62, os dados demonstraram que as plântulas cujos explantes foram desidratados por 8, 10 e 12 horas e criopreservados, apresentaram crescimento semelhante ao das plântulas do tratamento controle e dos demais correspondentes não criopreservados, plântulas desses tratamentos foram aclimatizadas em sistema semi hidropônico.

Decorridos 180 dias de cultivo, observou-se que ao final do período de aclimatização, o processo de criopreservação não afetou a sobrevivência das plantas, tendo em vista que as plantas dos tratamentos cujos embriões zigóticos foram desidratados por 8, 10 e 12 horas e imersos em nitrogênio líquido não apresentaram diferenças significativas na porcentagem de sobrevivência quando comparadas ao controle, sendo que 70% das plântulas foram capazes de sobreviver ao processo de aclimatização.

O desenvolvimento da parte aérea não foi afetado pelo processo de congelamento dos embriões zigóticos em nitrogênio líquido e nem pelo tempo de desidratação dos explantes, tendo em vista que não foram observadas diferenças significativas quanto ao comprimento da parte aérea em relação ao tratamento controle e os demais tratamentos cujos embriões foram submetidos ao processo de congelamento (Figura 6a). No entanto, o comprimento da maior raiz foi menor no tratamento cujos embriões foram desidratados por 12 horas e criopreservados, quando comparado ao tratamento controle (Figura 6b).

Figura 6 – Crescimento de plantas aclimatizadas de *Coffea arabica* L. cv. Catuaí vermelho (IAC 144) após o processo de criopreservação, quanto ao comprimento da parte aérea e raiz.

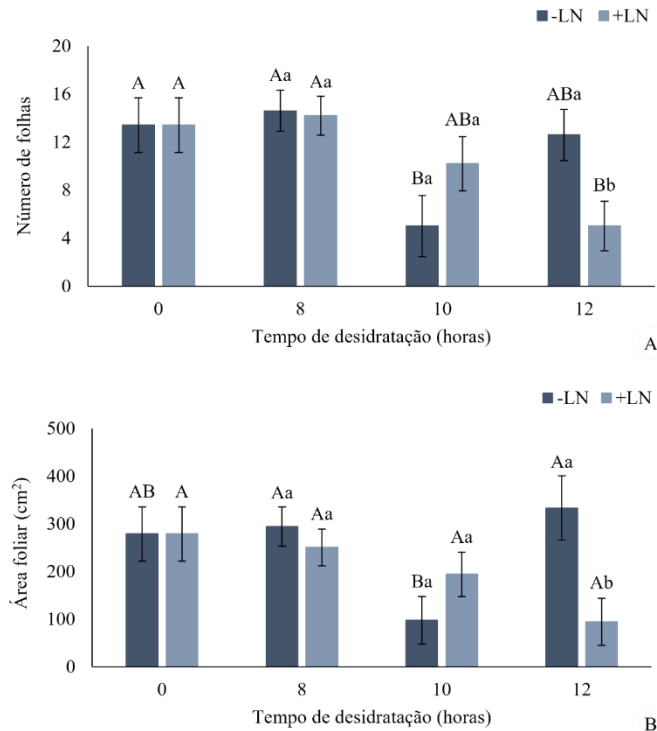


Legenda: Efeito do tempo de desidratação (0, 8, 10 e 12 horas) de embriões zigóticos de *Coffea arabica* L. cv. Catuaí vermelho (IAC 144) não imersos em nitrogênio líquido (-LN) ou imersos em nitrogênio líquido (+LN) no número comprimento da parte aérea (A) e comprimento da maior raiz (B). Médias seguidas da mesma letra maiúscula (tempo de desidratação) e médias seguidas da mesma letra minúscula (imersas ou não em nitrogênio líquido) não apresentam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Fonte: Do autor (2021).

O número de folhas e a área foliar não foram alteradas pelo processo de criopreservação. Nos tempos de 8 e 10 horas de desidratação de embriões zigóticos e imersão em nitrogênio líquido não foram observadas diferenças significativas em comparação aos não imersos em nitrogênio líquido e controle (Figura 7).

Figura 7 – Crescimento de plantas aclimatizadas de *Coffea arabica* L. cv. Catuaí vermelho (IAC 144) após o processo de criopreservação, quanto ao número de folhas e área foliar.



Legenda: Efeito do tempo de desidratação (0, 8, 10 e 12 horas) de embriões zigóticos de *Coffea arabica* L. cv. Catuaí vermelho (IAC 144) não imersos em nitrogênio líquido (-LN) ou imersos em nitrogênio líquido (+LN) no número de folhas (A) e área foliar (B). Médias seguidas da mesma letra maiúscula (tempo de desidratação) e médias seguidas da mesma letra minúscula (imersas ou não em nitrogênio líquido) não apresentam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Fonte: Do autor (2021).

O peso fresco e seco da parte aérea e sistema radicular nos tempos de 8 e 10 horas de desidratação, cujos embriões foram imersos em nitrogênio líquido, foram estatisticamente semelhantes aos de plantas cujos embriões zigóticos não foram imersos em nitrogênio líquido e ao controle (Figura 8).

Figura 8 – Crescimento de plantas aclimatizadas de *Coffea arabica* L. cv. Catuaí vermelho (IAC 144) após o processo de criopreservação, quanto ao peso fresco e seco da parte aérea e do sistema radicular (Continua).

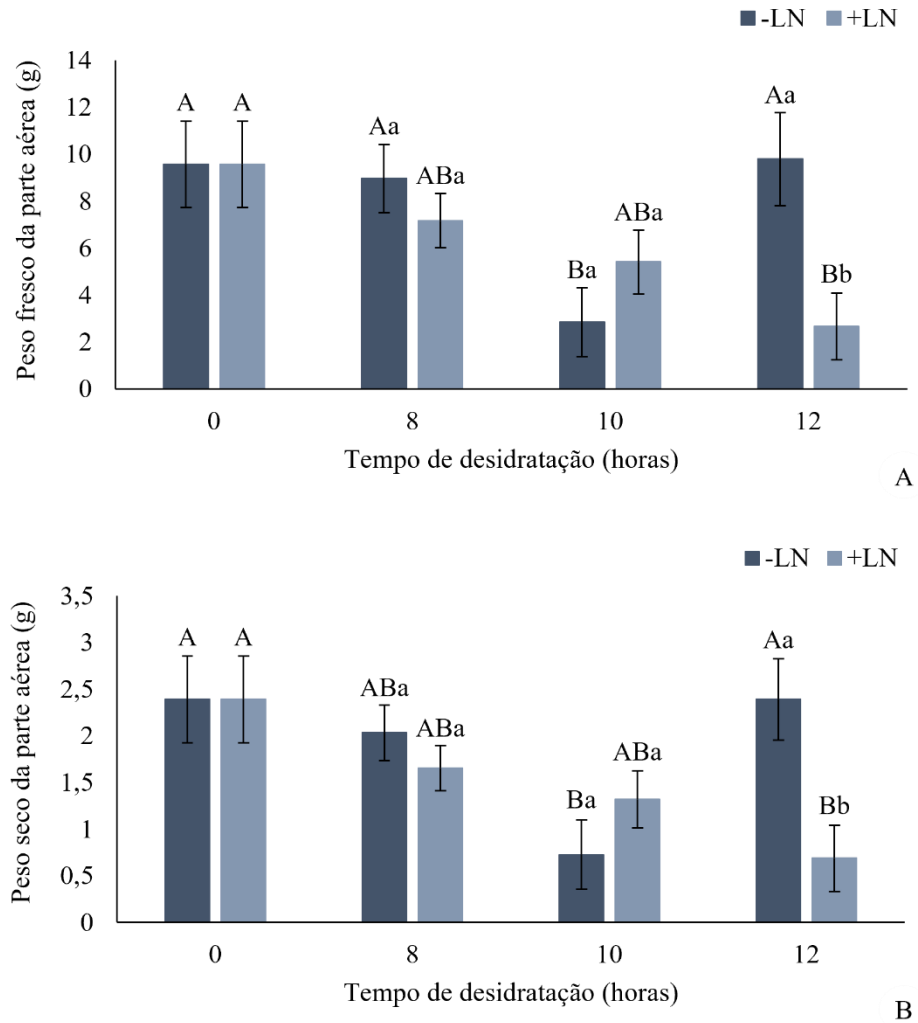
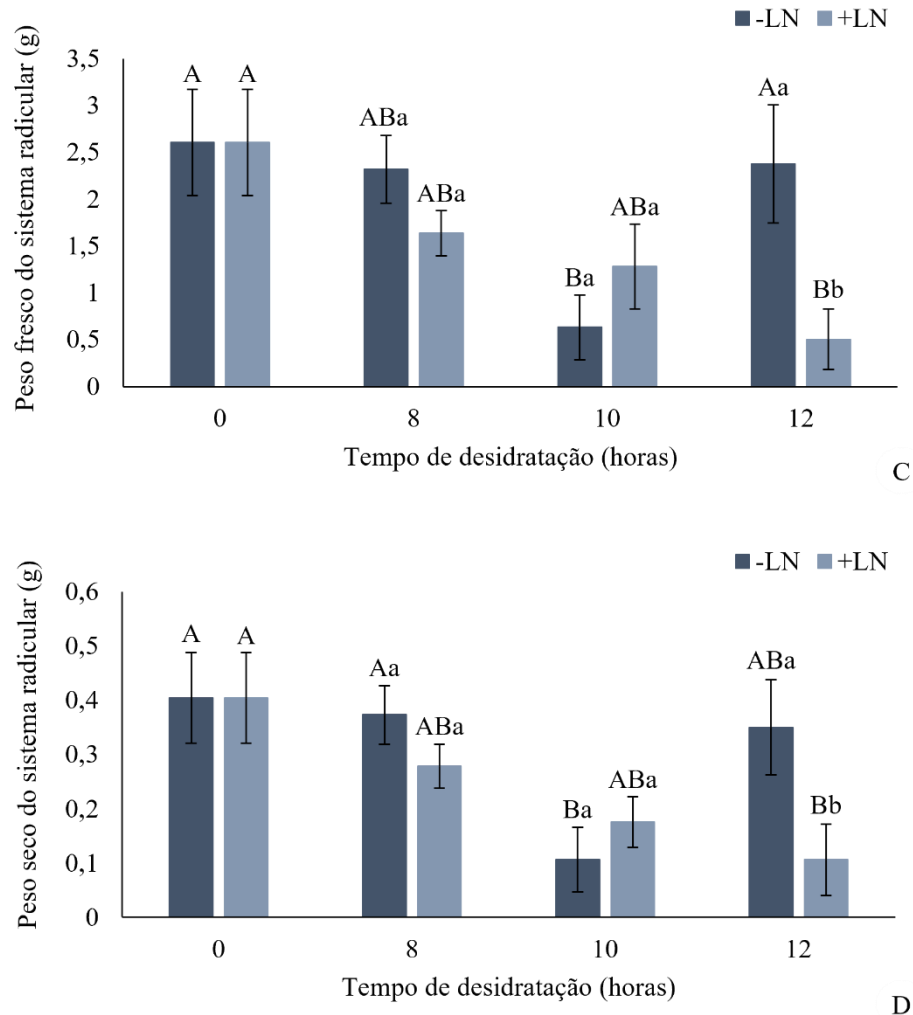


Figura 8 – Crescimento de plantas aclimatizadas de *Coffea arabica* L. cv. Catuaí vermelho (IAC 144) após o processo de criopreservação, quanto ao peso fresco e seco da parte aérea e do sistema radicular (Conclusão).

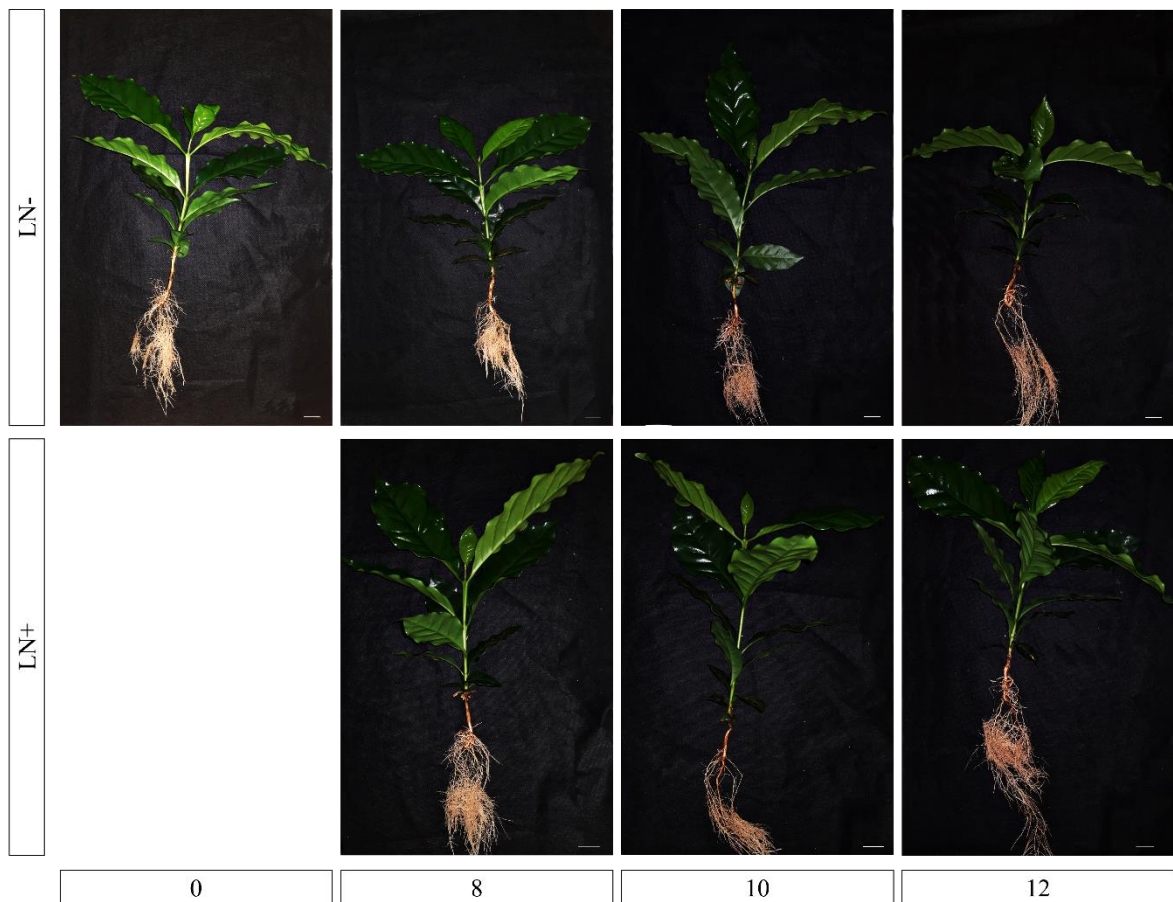


Legenda: Efeito do tempo de desidratação (0, 8, 10 e 12 horas) de embriões zigóticos de *Coffea arabica* L. cv. Catuaí vermelho (IAC 144) não imersos em nitrogênio líquido (-LN) ou imersos em nitrogênio líquido (+LN) no peso fresco da parte aérea (A), peso seco da parte aérea (B), peso fresco do sistema radicular (C) e peso seco do sistema radicular (D). Médias seguidas da mesma letra maiúscula (tempo de desidratação) e médias seguidas da mesma letra minúscula (imersas ou não em nitrogênio líquido) não apresentam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Fonte: Do autor (2021).

Aos 180 dias as plantas aclimatizadas não apresentavam anormalidades quanto a formação de parte aérea e raízes (Figura 9).

Figura 9 – Mudanças aclimatizadas de *Coffea arabica* L. cv. Catuaí vermelho (IAC 144) após o processo de Criopreservação.



Legenda: Mudanças aclimatizadas, em referência aos tempos de desidratação (0, 8, 10 e 12 horas), de embriões zigóticos de *Coffea arabica* L. cv. Catuaí vermelho (IAC 144) não imersos em nitrogênio líquido (-LN) ou imersos em nitrogênio líquido (+LN). Barra = 2 cm.

Fonte: Do autor (2021).

4 DISCUSSÃO

Quando as plântulas regeneradas *in vitro* são transplantadas da sala de cultivo para as condições de estufa, pode ocorrer o dessecamento ou murcha rápida das mesmas e estas podem não ser capazes de sobreviver ao ambiente *ex vitro*, dessa forma, a etapa de aclimatização é o fator determinante que garante a efetividade dos protocolos de regeneração de plântulas *in vitro*, pois estas precisam ser reinseridas em seu ambiente natural.

O ambiente de cultivo *in vitro* é caracterizado por uma baixa intensidade luminosa, temperatura constante, condições assépticas, alta umidade relativa do ar e meio de cultivo com altas concentrações de carboidratos que favorece o crescimento heterotrófico das plântulas (HAZARIKA, 2006). No ambiente *ex vitro* (estufa ou campo), a umidade relativa do ar é inferior a 100%, a intensidade luminosa é muito maior do que a do ambiente *in vitro* e a

temperatura é variável, por conseguinte as plântulas necessitam converter rapidamente de um modo de nutrição heterotrófico para um totalmente autotrófico, quando transferidas do ambiente *in vitro* para o *ex vitro* (KUMAR; RAO, 2012), tendo em vista que as condições de cultivo *in vitro* resultam em plântulas com morfologia, anatomia e fisiologia diferentes daquelas que são cultivadas no campo (CHANDRA et al., 2010).

Como as condições do ambiente *in vitro* são diferentes do ambiente *ex vitro* geralmente são fornecidas condições ideais para maior sobrevivência, crescimento e estabelecimento de plântulas regeneradas *in vitro*, haja vista que as características fisiológicas e anatômicas das plântulas exigem que estas sejam gradualmente aclimatizadas a esse novo ambiente (HAZARIKA, 2006). Existem diferentes metodologias para garantir uma aclimatização bem-sucedida e a hidroponia se mostrou uma alternativa viável para esse processo.

O cultivo hidropônico que consiste no cultivo de culturas com ou sem um meio sólido usando uma solução nutritiva, já é utilizado comercialmente para o cultivo de diferentes hortaliças como: alface, espinafre, pepino, tomate, entre outras culturas (BIONE et al., 2021; ROSA-RODRÍGUEZ et al., 2020; CARVALHO LEAL et al., 2020; BARBOSA et al., 2015; GREWAL; MAHESHWARI; PARKS, 2011). E recentemente também tem sido observado que o uso da hidroponia é eficiente para a produção de mudas de café arábica. Em estudos realizados com mudas (de 60 dias após a semeadura) de diferentes cultivares de café arábica foi relatado que o sistema hidropônico proporcionou maior crescimento de mudas de café e estas apresentaram melhores características fisiológicas quando comparadas àquelas produzidas em sistema convencional (CUNHA et al., 2022; LIMA et al., 2021).

As vantagens do cultivo em hidroponia que consistem na redução de doenças transmitidas pelo solo, o que reduz o uso de defensivos agrícolas, menor tempo para o crescimento das plantas, em comparação ao cultivo em campo, pouca ou nenhuma influência das mudanças climáticas, o que favorece o cultivo das plantas em qualquer época do ano, redução da mão de obra, devido a automatização do sistema, economia de água e maior rendimento devido ao menor espaçamento entre as plantas (MAJID et al., 2021; SHARMA et al., 2018), fez com que o uso do sistema hidropônico fosse expandido para a aclimatização de plântulas micropropagadas, gerando resultados significativos na otimização desse processo.

Em um estudo realizado com plântulas de banana micropropagadas *in vitro*, foi relatado que o uso do sistema hidropônico, quando comparado ao sistema de cultivo tradicional (recipientes contendo substrato específico, com rega e fertilização regular), reduziu o tempo necessário para a aclimatização das plantas de bananeira ao acelerar o crescimento da parte

aérea e do sistema radicular das mesmas, além de propiciar redução de custos ao consumir menores volumes de água e fertilizantes (TOYOSUMI et al., 2021).

Resultados semelhantes foram observados para a aclimatização de plântulas de kiwi, cujo desenvolvimento da parte aérea e sistema radicular das plântulas aclimatizadas foi superior quando cultivadas em sistema hidropônico em comparação ao método tradicional, com redução de 45 dias no tempo necessário para aclimatização das mesmas, além de garantir 100% de sobrevivência das plantas (PUROHIT et al., 2021). A utilização do sistema hidropônico também se mostrou eficiente para a aclimatização de mandioca (CASTAÑEDA-MÉNDEZ et al., 2017), eucalipto (SILVA et al., 2011), pera (ALEKSANDROVA et al., 2021), plantas medicinais (DUAN et al., 2020), plantas ornamentais (TRAYKOVA; MOLLE; STANILOVA, 2022; ZHANG et al., 2019) e a partir deste estudo também se constatou que o sistema hidropônico é eficaz para a aclimatização de plântulas de cultivares de café arábica, utilizando a vermiculita como substrato.

Ao final do processo de aclimatização das cultivares de café arábica, catuaí amarelo-IAC 62 e catuaí vermelho IAC144, cujas plântulas foram originadas de embriões zigóticos criopreservados e regenerados *in vitro*, observou-se que a porcentagem de sobrevivência das mesmas foi alta e que as mudas de plântulas regeneradas após criopreservação dos embriões zigóticos não diferiram fenotipicamente das mudas de plântulas controle, cujos embriões zigóticos não foram criopreservados. A partir destes resultados, referentes ao processo de aclimatização, constata-se que o protocolo de criopreservação foi eficiente e que as plântulas obtidas são capazes de sobreviver ao serem transferidas para o ambiente *ex vitro* e posteriormente poderão ser transferidas para o ambiente natural, considerando que o congelamento em nitrogênio líquido dos embriões zigóticos não afetou o crescimento e a sobrevivência das mudas em ambientes não controlados.

A efetividade do sistema hidropônico para a aclimatização das plântulas pode estar relacionada a maior disponibilidade de água e regulação precisa da composição de nutrientes (VARDAR et al., 2015), que resultam em plantas com maior teor de clorofila, capacidade fotossintética e condutância estomática, quando comparadas às plantas cultivadas em sistema convencional (MAJID et al., 2021; DUAN et al., 2020; SOUZA et al., 2019). A fotossíntese é fator chave para o crescimento e produção de biomassa das plantas pois fornece a energia e o carbono necessários para a biossíntese dos compostos orgânicos requeridos para o desenvolvimento das espécies vegetais (NOWICKA et al., 2018).

Portanto, devido as vantagens do cultivo em sistema hidropônico para diferentes espécies vegetais, inclusive para produção de mudas de café e de acordo com os resultados

obtidos neste estudo, a aclimatização em hidroponia é uma técnica viável para a aclimatização de plântulas de café arábica regeneradas *in vitro* após o processo de criopreservação. Além disso, como o cultivo das mudas de café foi realizado em estufa sem condições controladas de umidade e temperatura, acredita-se que as mudas resultantes podem estar mais aptas para serem transferidas para o ambiente de campo.

5 CONCLUSÃO

A aclimatização das plantas regeneradas *in vitro* após a criopreservação de embriões zigóticos das cultivares de café arábica, catuaí amarelo-IAC 62 e catuaí vermelho IAC144, pode ser realizada por meio do sistema hidropônico, utilizando a vermiculita como substrato.

REFERÊNCIAS

- ALSHROUF, A. Hydroponics, aeroponic and aquaponic as compared with conventional farming. **American Academic Scientific Research Journal for Engineering, Technology, and Sciences**, v. 27, n. 1, p. 247-255, 2017.
- ALEKSANDROVA, D.; DIMITROVA, N.; NIKOLOVA, V.; NACHEVA, L. Floating system improves acclimatization of micropropagated pear plantlets. **Acta Horticulturae**, v.1327, p. 727-732, 2021.
- BARBOSA, G. L.; GADELHA, F. D. A.; KUBLIK, N.; PROCTOR, A.; REICHELM, L. WEISSINGER, E.; WOHLLEB, G. M.; HALDEN, R. U. Comparison of land, water, and energy requirements of lettuce grown using hydroponic vs. conventional agricultural methods. **International journal of environmental research and public health**, v. 12, n. 6, p. 6879-6891, 2015.
- BIONE, M. A. A.; SOARES, T. M.; COVA, A. M. W.; DA SILVA PAZ, V. P.; GHEYI, H. R.; RAFAEL, M. R. S.; MODESTO, F. J. N.; SANTANA, J. A.; DAS NEVES, B. S. L. Hydroponic production of 'Biquinho' pepper with brackish water. **Agricultural Water Management**, v. 245, p. 106607, 2021.
- CASTAÑEDA-MÉNDEZ, O.; OGAWA, S.; MEDINA, A.; CHAVARRIAGA, P.; SELVARAJ, M. G. A simple hydroponic hardening system and the effect of nitrogen source on the acclimation of *in vitro* cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 53, p. 75-85, 2017.
- CHANDRA, S.; BANDOPADHYAY, R.; KUMAR, V.; CHANDRA, R. Acclimatization of tissue cultured plantlets: From laboratory to land. **Biotechnology Letters**, v. 32, n. 9, p. 1199-1205, 2010.
- CUNHA, S. H.; LIMA, A. E.; CARVALHO, A. M.; GUIMARÃES, R. J.; CASTRO, E. M.; FARIA, M. M.; TERAMOTO, E. T. Modified hydroponics and phenolic foam as technological innovations in the production of coffee seedlings from cuttings. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 43, n. 1, p. 351-366, 2022.
- CARVALHO LEAL, L. Y.; SOUZA, E. R.; JÚNIOR, J. A. S.; SANTOS, M. A. Comparison of soil and hydroponic cultivation systems for spinach irrigated with brackish water. **Scientia Horticulturae**, v. 274, p. 109616, 2020.
- DUAN, J. X.; DUAN, Q. X.; ZHANG, S. F.; CAO, Y. M.; YANG, C. D.; CAI, X. D. Morphological, physiological, anatomical and histochemical responses of micropropagated plants of *Trichosanthes kirilowii* to hydroponic and soil conditions during acclimatization. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 142, p. 177-186, 2020.
- FAQUIN, V.; CHALFUN, N. N. J. Hidromudas: Processo de produção de porta-enxerto de mudas frutíferas, florestais e ornamentais enxertadas em hidroponia. **Instituto Nacional de Propriedade Intelectual. (BRN. PI 0802792-7)**, 2008.

FAWZY, S.; OSMAN, A. I.; DORAN, J.; ROONEY, D. W. Strategies for mitigation of climate change: A review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 18, n. 6, p. 2069-2094, 2020.

FREITAS, R. T.; PAIVA, R.; SALES, T. S.; SILVA, D. P. C.; REIS, M. V.; SOUZA, A. C.; ROSA, S. D. V. F. Cryopreservation of *Coffea arabica* L. zygotic embryos by vitrification. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, v. 44, n. 2, p. 445-451, 2016.

GREWAL, H. S.; MAHESHWARI, B.; PARKS, S. E. Water and nutrient use efficiency of a low-cost hydroponic greenhouse for a cucumber crop: An Australian case study. **Agricultural Water Management**, v. 98, n. 5, p. 841-846, 2011.

HAZARIKA, B. N. Acclimatization of tissue-cultured plants. **Current Science**, v. 85, n. 12, p. 1704-1712, 2003.

HAZARIKA, B. N. Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. **Scientia Horticulturae**, v. 108, n. 2, p. 105-120, 2006.

HOANG, N. N.; KITAYA, Y.; SHIBUYA, T.; ENDO, R. Development of an *in vitro* hydroponic culture system for wasabi nursery plant production—Effects of nutrient concentration and supporting material on plantlet growth. **Scientia Horticulturae**, v. 245, p. 237-243, 2019.

KUMAR, K.; RAO, I. U. Morphophysiological problems in acclimatization of micropropagated plants in *ex vitro* conditions-A Reviews. **Journal of Ornamental and Horticultural Plants**, v. 2, n. 4, p. 271-283, 2012.

LIMA, A. E. D.; GUIMARÃES, R. J.; CUNHA, S. H. B. D.; CASTRO, E. D. M.; CARVALHO, A. M. D.; FARIA, M. M. L. Seedling production of *Coffea arabica* from different cultivars in a modified hydroponic system and nursery using different containers. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 45, n. e017821, p. 1-10, 2021.

MAJID, M.; KHAN, J. N.; SHAH, Q. M. A.; MASOODI, K. Z.; AFROZA, B.; PARVAZE, S. Evaluation of hydroponic systems for the cultivation of Lettuce (*Lactuca sativa* L., var. Longifolia) and comparison with protected soil-based cultivation. **Agricultural Water Management**, v. 245, p. 106572, 2021.

MURASHIGE T.; SKOOG F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NOWICKA, B.; CIURA, J.; SZYMAŃSKA, R.; KRUK, J. Improving photosynthesis, plant productivity and abiotic stress tolerance—current trends and future perspectives. **Journal of Plant Physiology**, v. 231, p. 415-433, 2018.

PUROHIT, S.; RAWAT, J. M.; PATHAK, V. K.; SINGH, D. K.; RAWAT, B. A hydroponic-based efficient hardening protocol for *in vitro* raised commercial kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 57, n. 3, p. 541-550, 2021.

ROSA-RODRÍGUEZ, R. D. L.; LARA-HERRERA, A.; TREJO-TÉLLEZ, L. I.; PADILLA-BERNAL, L. E.; SOLIS-SÁNCHEZ, L. O.; ORTIZ-RODRÍGUEZ, J. M. Water and

fertilizers use efficiency in two hydroponic systems for tomato production. **Horticultura Brasileira**, v. 38, p. 47-52, 2020.

SHARMA, N.; ACHARYA, S.; KUMAR, K.; SINGH, N.; CHAURASIA, O. P. Hydroponics as an advanced technique for vegetable production: An overview. **Journal of Soil and Water Conservation**, v. 17, n. 4, p. 364-371, 2018.

SILVA, A. L. L.; OLIVEIRA, Y. D.; COSTA, J. D. L.; SCHEIDT, G. N.; CARVALHO, D. C.; SANTOS, J. D.; GUERRA, E. P. Pre-acclimatization and hydroponic acclimatization of micropropagated plants of *Eucalyptus saligna* Sm. **Revista Acadêmica Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 9, n. 2, p. 179-184, 2011.

SOUZA, P. F.; BORGHEZAN, M.; ZAPPELINI, J.; CARVALHO, L. R.; REE, J.; BARCELOS-OLIVEIRA, J. L.; PESCADOR, R. Physiological differences of 'Crocantela' lettuce cultivated in conventional and hydroponic systems. **Horticultura Brasileira**, v.37, p. 101-105, 2019.

TOYOSUMI, I. D. S.; SILVA, T. S. M. D.; MELO, D. M.; AZEVEDO NETO, A. D. D.; SOARES, T. M.; COELHO FILHO, M. A. Optimization of banana plantlets acclimatization by hydroponic cultivation. **Scientia Agricola**, v. 78, p. e20200165, 2021.

TRAYKOVA, B.; MOLLE, E.; STANILOVA, M. *In vivo* and *in vitro* bulb multiplication of *Lilium rhodopaeum* Delip. and growth acceleration using hydroponic technologies. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, p. 1-13, 2022.

TREFTZ, C.; OMAYE, S. T. Hydroponics: Potential for augmenting sustainable food production in non-arable regions. **Nutrition & Food Science**, v. 46, n. 5, p. 672-684, 2016.

VARDAR, G.; ALTIKATOĞLU, M.; ORTAÇ, D.; CEMEK, M.; İŞILDAK, İ. Measuring calcium, potassium, and nitrate in plant nutrient solutions using ion-selective electrodes in hydroponic greenhouse of some vegetables. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 62 n. 5, p. 663-668, 2015.

ZHANG, Y. S.; GU, S. J.; CHEN, J. J.; CAI, X. D. Effects of different nutrient solutions on the acclimatization of *in vitro* Caladium plantlets using a simplified hydroponic system. **Sains Malays**, v. 48, p. 1627-1633, 2019.