

Criopreservação de germoplasma de abacaxi pela técnica de vitrificação em gotas



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Mandioca e Fruticultura
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

**BOLETIM DE PESQUISA
E DESENVOLVIMENTO
95**

**Criopreservação de germoplasma de abacaxi
pela técnica de vitrificação em gotas**

*Fernanda Vidigal Duarte Souza
Everton Hilo de Souza
Ergun Kaya
Patrícia Araújo Guerra
Carlos Alberto da Silva Ledo*

Embrapa Mandioca e Fruticultur
*Cruz das Almas, BA
2018*

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Mandioca e Fruticultura
Rua Embrapa - s/n, Caixa Postal 007
44380-000, Cruz das Almas, BA
Fone: (75) 3312-8048
Fax: (75) 3312-8097
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações
da Embrapa Mandioca e Fruticultura

Presidente
Francisco Ferraz Laranjeira

Secretário-Executivo
Lucidalva Ribeiro Gonçalves Pinheiro

Membros
Aldo Vilar Trindade, Ana Lúcia Borges, Eliseth de Souza Viana, Fabiana Fumi Cerqueira Sasaki, Harllen Sandro Alves Silva, Leandro de Souza Rocha, Marcela Silva Nascimento, Marcio Carvalho Marques Porto

Supervisão editorial
Francisco Ferraz Laranjeira

Revisão de texto
Adriana Villar Tullio Marinho

Normalização bibliográfica
Lucidalva Ribeiro Gonçalves Pinheiro

Tratamento das ilustrações
Anapaula Rosário Lopes

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
Anapaula Rosário Lopes

Foto da capa
*Everton Hilo de Souza e
Fernanda Vidigal Duarte Souza*

1ª edição
On-line (2018)

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Mandioca e Fruticultura

Criopreservação de germoplasma de abacaxi pela técnica de vitrificação em gotas / Fernanda Vidigal Duarte Souza... [et. al.]. – Cruz das Almas, BA : Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2019.

28 p.: il. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Mandioca e Fruticultura, ISSN 1809-5003; 95).

Publicação disponibilizada on-line no formato PDF.

1. Abacaxi. 2. Criopreservação. I. Souza, Everton Hilo de. II. Kaya, Ergun de. 2. III. Guerra; Patrícia Araújo. IV. Ledo, Carlos Alberto da Silva. V. Título. VI. Série.

CDD 634.774

© Embrapa, 2018

Sumário

Resumo	5
Abstract	7
Introdução.....	9
Material e Métodos	11
Resultados e Discussão	15
Considerações finais	25
Agradecimentos.....	25
Referências	25

Criopreservação de germoplasma de abacaxi pela técnica de vitrificação em gotas

Fernanda Vidigal Duarte Souza¹

Everton Hilo de Souza²

Ergun Kaya³

Patrícia Araújo Guerra⁴

Carlos Alberto da Silva Ledo⁵

Resumo – A criopreservação é uma técnica que permite a conservação de germoplasma por longo prazo. Dentre os protocolos utilizados nos procedimentos de criopreservação a vitrificação em gotas (*droplet vitrification*) mostrou resultados eficientes na conservação de ápices caulinares de genótipos silvestres, cultivados e híbridos de abacaxizeiros. O objetivo deste boletim de pesquisa é divulgar o uso do protocolo de vitrificação em gotas de ápices caulinares como metodologia para criopreservação de germoplasma de abacaxi. A metodologia consiste na extração de ápices caulinares em tamanhos bem reduzidos, a partir de plantas mantidas *in vitro*, desidratação por um período de 48 horas em meio de pré-cultivo suplementado com alta concentração de sacarose, tratamento em solução de vitrificação (*plant vitrification solution*, PVS2) e finalmente, imersão em nitrogênio líquido e posterior regeneração. O método apresentado neste boletim possibilitou a obtenção de índices de sobrevivência e regeneração em torno de 70%, a depender do tempo de tratamento na solução de PVS2, e também do genótipo. Neste trabalho demonstramos a criopreservação de ápices de 16 genótipos de abacaxi pertencentes a quatro variedades botânicas, para estabelecer uma forma de conservação de longo prazo. Os resultados aqui

¹ Bióloga, Ph.D em Biologia Celular, pesquisadora da Embrapa Mandioca e Fruticultura

² Engenheiro-agrônomo, Dr. em Ciências, professor do PPG-RGV/ UFRB e pós-doutorando PNPD/ Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

³ Ph.D em Biologia Celular, professor da Mugla Üniversitesi, Department of Molecular Biology and Genetic, Muğla, Turkey.

⁴ Biotecnologista, M.Sc. em Recursos Genéticos Vegetais, técnica do Instituto Federal da Bahia.

⁵ Engenheiro-agrônomo, Dr. em Genética e Melhoramento de Plantas, pesquisador da Embrapa Mandioca e Fruticultura.

obtidos já estão sendo ampliados para um número maior de acessos do Banco de Germoplasma de *Ananas* e constituirá uma das duplicatas de segurança deste valioso recurso genético.

Termos de indexação: *Ananas comosus* (L.) Mer., conservação *ex situ*, crioinjúrias, nitrogênio líquido, PVS2.

Cryopreservation of pineapple germplasm by the droplet vitrification technique

Abstract – Cryopreservation is a technique that permits conservation of germplasm for long periods. Among the protocols used for cryopreservation, droplet vitrification has produced efficient results for preservation of shoot tips of wild, cultivated and hybrid pineapple genotypes. The objective of this research bulletin is to describe the use of the shoot tip droplet vitrification protocol for cryopreservation of pineapple germplasm. The method consists of extraction of small shoot tips from plants maintained *in vitro*, followed dehydration for 48 hours in pre-culture medium supplemented with a high sucrose concentration, treatment with plant vitrification solution (PVS2), and finally immersion in liquid nitrogens and subsequent regeneration. The method presented here allowed obtaining survival and regeneration indices of about 70%, depending on the treatment time in the PVS2 solution and the genotype. We demonstrate here the cryopreservation of shoot tips of 16 pineapple genotypes belonging to four botanical varieties, to establish an effective method of long-term conservation. The protocol described is being extended to a larger number or accessions of the Pineapple Active Germplasm Bank and will enable maintaining security duplicates of this valuable genetic resource.

Indexation terms: *Ananas comosus* (L.) Mer., *ex situ* conservation, cryo-injuries, liquid nitrogen, PVS2.

Introdução

Estratégias conservacionistas aliadas às mudanças comportamentais vêm sendo promovidas em diferentes esferas, na tentativa de minorar o quadro atual de degradação ambiental que vem provocando perdas significativas na biodiversidade vegetal.

Dentro deste contexto, o germoplasma voltado para a alimentação e a agricultura torna-se cada vez mais ameaçado por uma erosão genética que aumenta em velocidade alarmante. A conservação e a disponibilização desse germoplasma são consideradas estratégicas para o mundo, e estão asseguradas no Tratado Internacional de Recursos Genéticos para a Alimentação e Agricultura, organizado pela FAO (2005) e que tem 146 países signatários, inclusive o Brasil. O tratado legisla sobre a forma como os países devem lidar com sua dependência, mas também com sua soberania sobre o recurso genético de seu interesse e é considerado, atualmente, como o instrumento legal e direcionador mais importante referente ao tema. A soberania dos países sobre os recursos genéticos existentes passa, principalmente, por uma política de conservação adequada.

As formas de conservação existentes podem ser *in situ*, onde o recurso genético é mantido em sua condição natural como reservas, parques florestais etc e *ex situ* sob forma de coleções e bancos de germoplasma que podem ser estabelecidas a partir de diferentes estratégias e metodologias (Scariot; Sevilla, 2007; Walter et al., 2007; Souza et al., 2012; Souza et al., 2016).

A complexidade e as implicações políticas que envolvem a conservação *in situ* e, a total impossibilidade de serem conservadas desta forma, no caso de algumas espécies, levou à busca constante por estratégias e métodos que possibilitem a conservação fora do ambiente natural, de forma segura e com custos razoáveis.

O estabelecimento de Bancos de Germoplasma é, portanto, uma necessidade premente e que vem sendo realizado nas últimas décadas praticamente em todos os países. Os modelos para a conservação são muitos e dependem de uma série de fatores. Bancos de sementes ortodoxas, coleções de campo, *on farm*, *in vitro* ou em criobancos possuem características e peculiaridades próprias que devem ser avaliadas ao se decidir sobre a melhor forma de conservar o germoplasma de uma espécie

(Liu et al., 2018; Souza et al., 2012; Ninot et al., 2018, Silva et al., 2016; Popov et al., 2006).

O abacaxi [*Ananas comosus* (L.) Mer.], como uma das frutas tropicais mais consumidas no mundo e largamente cultivada no Brasil e em vários países, tem seu centro de origem mais importante no Brasil, que abriga a maior variabilidade genética do gênero (Souza et al., 2012). A antropização e o uso de poucas variedades para o cultivo tem causado grave erosão genética no gênero, demandando ações urgentes, voltadas à conservação deste germoplasma.

O Banco Ativo de Germoplasma de abacaxi (BAG Abacaxi) da Embrapa Mandioca e Fruticultura resguarda uma variabilidade genética representativa da espécie e é fruto de coletas realizadas nos últimos 40 anos (Souza et al., 2012). Entretanto, esse banco se encontra em condições de campo, sujeito às intempéries, além de vários acessos apresentarem problemas com o vírus da murcha do abacaxizeiro (PMWaV, *Pineapple Mealybug Wilt-associated Virus*), o que vem demandando ações específicas também nesta direção.

Atualmente o BAG abacaxi possui quase 700 acessos, distribuídos em duas espécies e diferentes variedades botânicas: *Ananas comosus* (L.) Merr., *Ananas comosus* (L.) Merr. var. *microstachys* L.B.Sm., *Ananas comosus* (L.) Merr. var. *bracteatus* (Lindl.) Coppens & F.Leal, *Ananas comosus* (L.) Merr. var. *erectifolius* (L.B.Sm.) Coppens & F.Leal, *Ananas comosus* (L.) Merr. var. *paraguayensis* (Camargo & L.B.Sm.) Coppens & F.Leal, *A. macrodontes* E.Morren e outras espécies afins (Souza et al., 2007; 2012).

A introdução de uma duplicata de segurança *in vitro* foi iniciada em 2003 sob condições de crescimento mínimo (Canto et al., 2004; Souza et al., 2006). No entanto, ainda que essa estratégia solucione algumas limitações da conservação em campo, é extremamente laboriosa, principalmente pela necessidade de subcultivos constantes e cujos intervalos são variáveis, além da possibilidade de ocorrência de variação somaclonal (Silva et al., 2016).

Com a evolução da criopreservação nas últimas décadas, esta passa a ser uma alternativa extremamente interessante, visto que mantém as coleções conservadas por longos períodos em temperaturas ultrabaixas (-196 °C), ou em sua fase de vapor, a -150 °C (Reed, 2008). Essa técnica pode assegurar a conservação de material biológico por longos períodos de

tempo, sem a necessidade de intervenções periódicas, uma vez que, em temperaturas ultrabaixas, o metabolismo celular fica tão reduzido que a deterioração biológica é virtualmente paralisada (Reed, 2008; Panis, 2009). A paralisação do metabolismo da planta, mantendo, entretanto, a integridade celular, torna essa forma de conservação atrativa e de baixo custo (Benson, 2008). Por outro lado, o custo elevado dessa técnica está no estabelecimento da estrutura básica de armazenamento, ou seja, os tanques criogênicos e o sistema de fluxo de nitrogênio (Reed, 2008; Panis, 2009).

O uso sistemático desta estratégia de conservação ainda demanda pesquisas e ajustes de fatores considerados limitantes. Um dos aspectos mais problemáticos é o elevado nível de especificidade no comportamento das espécies quando submetidas às condições de ultracongelamento, criando um genótipo-dependência no desenvolvimento de protocolos e por isso a necessidade de estudos dirigidos para as espécies de interesse. Em abacaxi, alguns trabalhos já vêm sendo realizados desde a década de 90 (Engelmann, 2000; Gonzalez-Arno et al., 1998). Técnicas de criopreservação têm sido aplicadas nas últimas décadas para muitas espécies, incluindo cultivares comerciais de abacaxi (Barraco et al., 2011; Capuana; Lonardo, 2013; Wang et al., 2014; Kaya; Souza, 2017; Kaya et al., 2017; Souza et al., 2017; González-Arno et al., 1998, 2000; Gamez-Pastrana et al., 2004; Martinez-Montero et al., 2005, 2012; Oliveira et al., 2016; Souza et al., 2016).

O objetivo deste boletim de pesquisa é fornecer de forma detalhada uma técnica eficiente de vitrificação em gotas (*droplet vitrification*) em genótipos silvestres, cultivados e híbridos de abacaxizeiros com a finalidade de se estabelecer uma duplicata de segurança de longo prazo para germoplasma de abacaxi.

Material e Métodos

Material vegetal

Para a realização deste trabalho foram consideradas variedades silvestres, comerciais e híbridos dos programas de melhoramento genético da Embrapa Mandioca e Fruticultura e os genótipos MD2, CO2, H155 e Hana89, que são genótipos do programa de melhoramento genético do Havaí (Tabela 1).

Um resumo da sequência metodológica utilizada para criopreservação de germoplasma de abacaxi pelo método de vitrificação em gotas pode ser observado na Figura 1.

Fotos: Fernanda Vidigal Duarte Souza e Everton Hilo de Souza



Figura 1. Seqüência metodológica para criopreservação de germoplasma de abacaxi pelo método de vitrificação em gotas.

Tabela 1. Genótipo, procedência e status em 16 abacaxizeiros usados para a criopreservação.

Código	Variedade botânica	Procedência	Situação do genótipo
BGA-17, BGA-20, BGA-35 e BGA-128	<i>Ananas comosus</i> var. <i>bracteatus</i>	BAG-Embrapa	Cultivares silvestres
BGA-471 e BGA-472	<i>A. comosus</i> var. <i>microstachys</i>	BAG-Embrapa	Cultivares silvestres
BGA-224 e BGA-739	<i>A. comosus</i> var. <i>erectifolius</i>	BAG-Embrapa	Cultivares silvestres
'Pérola', 'Ajubá', 'BRS Imperial'	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	Brasil	Cultivar comercial no Brasil
MD2	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	EUA	Cultivar comercial dos EUA e outros países
CO2, H155 e Hana89	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	TPGRD – ARS/USDA	Híbrido do programa de melhoramento do Havaí
ORN	<i>A. comosus</i> var. <i>bracteatus</i> x <i>A. comosus</i> var. <i>erectifolius</i>	EMBRAPA	Cultivar ornamental

Padronização do material de partida

Antes dos procedimentos criogênicos, para a obtenção do material de partida padronizado, plantas *in vitro* foram subcultivadas por 45 dias em magentas contendo 50 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962, Sigma MS-519) suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 0,02 mg L⁻¹ de BAP e 2,2 g L⁻¹ de phytagel com pH ajustado para 5,8. As culturas foram mantidas em uma temperatura de 27 ± 2 °C com um fotoperíodo de 16 h e intensidade luminosa de 50 μmol⁻¹ m⁻² s⁻¹).

Vitrificação em gotas

Os ápices caulinares foram excisados com tamanho aproximado de 0,5 mm em ambiente asséptico (câmara de fluxo laminar) com o auxílio

de um estereoscópico, deixando-se um único primórdio foliar. Após este procedimento foram colocados em placa de Petri contendo meio de pré-cultivo (MS suplementado com 0,3 M de sacarose e 10 g L⁻¹ de ágar) e incubados em câmara de crescimento na ausência de luz, por 48 horas a fim de favorecer a desidratação dos ápices caulinares. Após o período de incubação os ápices caulinares foram depositados em lâminas de alumínio (2,5 cm x 0,5 cm) contendo 10 gotas de 4 µL da solução de vitrificação PVS-2 [MS com 3,26 M (w/v) de glicerol, 2,42 M (w/v) de etileno glicol (w/v), 1,9 M (w/v) de DMSO e 0,4 M (w/v) de sacarose] em três diferentes tempos de exposição: 30 min, 45 min e 60 min. As lâminas foram colocadas em placas de Petri que, por sua vez, foram depositadas sobre gelo, garantindo um temperatura próxima aos 0 °C.

Uma vez completado o tempo, com o auxílio de uma pinça, as lâminas contendo os ápices foram inseridas dentro dos criotubos estéreis, sendo presos nas cânulas e imersos rapidamente no nitrogênio líquido (NL), onde permaneceram por 24 horas. Após a retirada do NL os ápices foram imersos em solução de lavagem (MS líquido suplementado com 1 M de sacarose) por 20 min e cultivados posteriormente em placas de Petri contendo meio de regeneração (MS com 0,2 mg L⁻¹ de ANA e 0,5 mg L⁻¹ de BAP e 30 g L⁻¹ de sacarose e 10 g L⁻¹ de ágar). As placas foram incubadas em câmara de crescimento, na ausência de luz, nas primeiras 48 horas. Passado este período inicial as placas permaneceram em sala de crescimento sob condições de luz e com fotoperíodo de 16 horas a uma temperatura de 25 °C.

Avaliação da sobrevivência e regeneração

O efeito dos diferentes tratamentos foi avaliado pela medição da porcentagem de sobrevivência e recuperação dos ápices caulinares criopreservados. Sobrevivência corresponde a presença de tecidos vivos e a observação de qualquer crescimento após 7 dias. Recuperação correspondente a produção normal de brotos a partir de explantes tratados, observado após 8 semanas (Barraco et al., 2011).

Análises estatísticas

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com dez repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por um ápice caulinar. Um controle absoluto foi realizado a partir do cultivo de 10 ápices caulinares em meio de pré-cultivo, assim como um controle relativo ao efeito do PVS2 consistiu de 10 ápices expostos ao PVS2 nos mesmos intervalos de tempo do material criopreservado sem, no entanto, passar pelo nitrogênio líquido. Foram realizadas três repetições experimentais para cada ensaio.

Os dados foram submetidos à análise de variância considerando o delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 16 x 3 (genótipos x tempo de PVS2). Os dados de porcentagem foram transformados para arc sen ($\sqrt{x/100}$) visando o atendimento das pressuposições da análise de variância. A comparação das médias foi realizada pelo teste de Scott-Knott (genótipos) e Tukey (tempo de exposição ao PVS2) à 1% de probabilidade. Utilizou-se o programa computacional SAS System, versão 9.2 para a análise dos dados (SAS Institute 2010).

Aclimação

Após o resgate em meio de cultivo, as plantas obtidas nos diferentes tratamentos foram transplantadas em vasos de polietileno contendo substrato comercial e mantidas em casa de vegetação com sombreamento de 60%, temperatura média diária de 27 °C e 65,5% de umidade relativa média. Foram avaliadas as taxas de sobrevivência nos primeiros 30 dias e a ocorrência de variações morfológicas aos 120 dias após a aclimação das plantas.

Resultados e Discussão

Não foi registrada nenhuma morte de ápice caulinar nos controles do pré-cultivo em meio com sacarose. A interação entre genótipo e tempos de exposição ao PVS2 foi significativa tanto nos tratamentos controle (LN-) quanto após o congelamento em nitrogênio líquido (LN+). Nos resultados obtidos com os controles foi possível constatar que o efeito da solução de vitrificação sobre a sobrevivência e recuperação dos ápices variou de acordo com essa interação. O menor valor registrado (40 %) foi com o BGA-

20 aos 60 min de exposição à solução, enquanto que as maiores taxas de sobrevivência (100%) foram obtidas com o BGA-128 aos 30 e 45 min, ambos pertencentes à variedade *A. comosus* var. *bracteatus*, deixando evidente a dependência em relação ao genótipo e não às variedades botânicas (Tabela 2). Na comparação das médias gerais foram identificadas diferenças significativas e, ao se considerar os genótipos, os resultados mostram que aos 60 min de PVS2, quase 40% dos genótipos (BAG-20, 'Imperial', MD2, 'Pérola', BGA-739, BGA-224) apresentaram taxas de sobrevivência mais baixas quando comparadas aos tempos de 30 min e 45 min, comprovando a menor tolerância destes genótipos a tempos mais prolongados de exposição (Tabela 2).

O efeito do congelamento sobre os ápices foi ainda mais evidente para todos os genótipos estudados, já que os valores registrados após a imersão em nitrogênio líquido (LN+) foram menores em todos os tempos de exposição, quando comparados com os controles. Os resultados obtidos após a imersão em nitrogênio líquido variaram de 16,66% no genótipo CO2 a 86,66% na cultivar Imperial e foram dependentes das variedades e do tempo de exposição ao PVS2 (Tabela 2), à semelhança do que ocorreu na ausência do congelamento. Os genótipos BGA-35, Imperial, BGA-224 e ORN apresentaram valores acima dos 70% de sobrevivência no tempo de 45 min de exposição. Para a maioria dos genótipos esse tempo de exposição apresentou os resultados mais satisfatórios, como pode ser observado na média geral comparando os três tempos de exposição, ainda que para outros genótipos não houvesse diferença estatística entre os tempos de PVS2. Por outro lado, o genótipo BGA-128, que no tratamento controle mostrou as mais altas taxas de sobrevivência, apresentou resposta inversa após o congelamento, deixando evidente que pode tolerar tempos mais elevados de exposição ao PVS2 para garantir proteção ao tecido e evitar as injúrias que causam a morte dos ápices. O melhor resultado obtido por este genótipo foi com 60 min de PVS2 com aproximadamente 50% de sobrevivência dos ápices.

De forma geral, as taxas de sobrevivência mais baixas foram obtidas com 30 min de exposição ao PVS2, seguido do tempo de 60 min. Para alguns genótipos a exposição a 60 min de PVS2 gerou resultados satisfatórios, mas que não diferiram de forma significativa dos tempos de menor exposição.

Não foi identificado um padrão de resposta diferenciado entre as variedades botânicas, silvestres ou cultivadas, enfatizando a dependência em relação ao genótipo e a necessidade de ensaios específicos. Os resultados das taxas de recuperação dos ápices praticamente não apresentaram diferenças, já que os valores estão acima de 80%, com uma única exceção feita ao genótipo CO2, que de todos os genótipos estudados foi o que mostrou os resultados mais baixos, tanto para a sobrevivência, quanto para a recuperação, incluindo o tratamento controle.

A aclimatização de mudas criopreservadas de abacaxizeiro resultou em 100% de sobrevivência de plantas oriundas de todos os tempos de exposição ao PVS2. Não foram identificadas nenhuma das variações morfológicas mais comuns em plantas de abacaxi oriundas de cultivo de tecidos, tais como presença de espinhos e variação foliar.

Tabela 2. Percentual de sobrevivência e regeneração de genótipos de abacaxizeiros (*Ananas comosus*) após a criopreservação pela técnica da vitrificação em gotas.

Genótipos	Sobrevivência (%) PVS2'			Regeneração (%) PVS2		
	30	45	60	30	45	60
	(NL-)**			(NL-)		
<i>A. comosus</i> var. <i>microstachys</i> (BGA-471)	70,00 bA	56,66 cB	83,33 aA	100,00 aA	96,66 aA	100,00 aA
<i>A. comosus</i> var. <i>microstachys</i> (BGA-472)	66,66 bB	53,33 cC	80,00 aA	100,00 aA	90,00 aA	86,66 aA
<i>A. comosus</i> var. <i>bracteatus</i> (BGA-128)	100,00 aA	100,00 aA	93,33 aA	100,00 aA	100,00 aA	100,00 aA
<i>A. comosus</i> var. <i>bracteatus</i> (BGA-17)	46,66 cB	66,66 bA	60,00 bA	100,00 aA	83,33 aA	90,00 aA

Continua...

Tabela 2. Continuação.

Genótipos	Sobrevivência (%) PVS2*			Regeneração (%) PVS2		
	30	45	60	30	45	60
	(NL-)**			(NL-)		
<i>A. comosus</i> var. <i>bracteatus</i> (BGA-20)	60,00 bA	60,00 bA	40,00 cB	96,66 aA	100,00 aA	100,00 aA
<i>A. comosus</i> var. <i>bracteatus</i> (BGA-35)	80,00 aA	93,33 aA	86,66 aA	83,33 aA	93,33 aA	93,33 aA
<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i> (Ajubá)	66,66 bB	86,66 aA	73,33 bA	100,00 aA	100,00 aA	96,66 aA
<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i> (CO2)	43,33 cA	46,66 cA	50,00 cA	63,33 bA	83,33 aA	66,66 aA
<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i> (H155)	90,00 aA	80,00 aA	-	100,00 aA	93,33 aA	-
<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i> (HANA89)	80,00 aA	60,00 bB	-	100,00 aA	86,66 aA	-
<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i> (Imperial)	80,00 aA	93,33 aA	73,33 bB	100,00 aA	100,00 aA	100,00 aA
<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i> (MD2)	83,33 aA	73,33 bB	76,66 bB	93,33 aA	100,00 aA	90,00 aA
<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i> (Pérola)	80,00 aA	86,66 aA	66,66 bB	86,66 aA	90,00 aA	93,33 aA
<i>A. comosus</i> var. <i>erectifolius</i> (BGA-739)	93,33 aA	66,66 bC	73,33 bB	93,33 aA	86,66 aA	100,00 aA
<i>A. comosus</i> var. <i>erectifolius</i> (BGA-224)	80,00 aA	80,00 aA	66,66 bB	100,00 aA	100,00 aA	100,00 aA
<i>A. comosus</i> var. <i>erectifolius</i> (ORN)	66,66 bB	86,66 aA	80,00 aA	100,00 aA	96,66 aA	86,66 aA
Média	74,17 B	74,37 B	71,66 A	94,79A	93,75A	93,09A
CV (%)	24,26			13,21		

Continua...

Tabela 2. Continuação.

Genótipos	Sobrevivência (%) PVS2*			Regeneração (%) PVS2		
	30	45	60	30	45	60
	(NL2+) ^{***}			(NL2+)		
<i>A. comosus</i> var. <i>microstachys</i> (BGA-471)	40,00 bA	33,33 cA	43,33 bA	100,00 aA	83,33 aA	96,66 aA
<i>A. comosus</i> var. <i>microstachys</i> (BGA-472)	40,00 bA	33,33 cA	43,33 bA	100,00 aA	90,00 aA	86,66 aA
<i>A. comosus</i> var. <i>bracteatus</i> (BGA-128)	23,33 cB	43,33 cAB	53,33 bA	93,33 aA	100,00 aA	80,00 aA
<i>A. comosus</i> var. <i>bracteatus</i> (BGA-17)	36,66 bB	56,66 bA	53,33 bA	100,00 aA	80,00 aA	86,66 aA
<i>A. comosus</i> var. <i>bracteatus</i> (BGA-20)	50,00 aA	63,33 bA	56,66 bA	100,00 aA	93,33 aA	100,00 aA
<i>A. comosus</i> var. <i>bracteatus</i> (BGA-35)	60,00 aA	76,66 aA	73,33 aA	93,33 aA	100,00 aA	90,00 aA
<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i> (Ajubá)	43,33 bB	63,33 bA	56,67 bA	90,00 aA	86,66 aA	86,66 aA
<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i> (CO2)	33,33 cA	30,00 cA	16,66 cA	30,33 bA	60,00 bA	100,00 aA
<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i> (H155)	60,00 aA	56,66 bA	-	100,00 aA	90,00 aA	-
<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i> (HANA89)	40,00 bA	20,00 dB	-	83,33 aA	100,00 aA	-
<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i> (Imperial)	36,66 bB	86,66 aA	53,33 bB	100,00 aA	90,00 aA	90,00 aA

Continua...

Genótipos	Sobrevivência (%) PVS2'			Regeneração (%) PVS2		
	30	45	60	30	45	60
	(NL2+) ^{***}			(NL2+)		
<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i> (MD2)	56,66 aA	60,00 bA	50,00 bA	86,66 aA	100,00 aA	93,33 aA
<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i> (Pérola)	33,33 cB	66,66 bA	26,66 cB	80,00 aA	93,33 aA	86,66 aA
<i>A. comosus</i> var. <i>erectifolius</i> (BGA-739)	33,33 cB	63,33 bA	43,33 bAB	90,00 aA	93,33 aA	100,00 aA
<i>A. comosus</i> var. <i>erectifolius</i> (BGA-224)	36,66 bB	73,33 aA	33,33 cB	100,00 aA	100,00 aA	100,00 aA
<i>A. comosus</i> var. <i>erectifolius</i> (ORN)	40,00 bB	76,66 aA	46,66 bB	100,00 aA	86,66 aA	83,33 aA
Média	41,45 B	56,45 A	46,42 B	90,44A	90,42A	91,43A
CV (%)	18,78			14,36		

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott e Tuket, respectivamente a 1% de probabilidade.

(*) Solução de vitrificação; (**) Na ausência de nitrogênio; (***) Em presença de nitrogênio.

Os resultados após o congelamento, que variaram de 44% a 86% entre os diferentes genótipos, podem ser considerados muito bons. Vale ainda destacar, que a despeito dos bons resultados obtidos anteriormente com outros métodos de criopreservação de abacaxi, o protocolo aqui estabelecido é menos laborioso e os resultados obtidos alcançam uma gama representativa de variedades botânicas do gênero *Ananas*, podendo ser indicado para o estabelecimento de criobancos de germoplasma do gênero (Gonzalez Arnao et al., 1998; Martinez-Montero et al., 2005; 2012).

A condição de pré-cultivo (0,3 M sacarose/ 48 horas) já havia sido testada em trabalhos anteriores mas, com variedades silvestres este é o primeiro relato (Gonzalez Arnao et al., 1998; Martinez-Montero et al., 2005). Esta condição inicial é crucial para induzir a tolerância dos tecidos ao processo de desidratação por vitrificação. O pré-cultivo com sacarose não causou danos celulares em nenhum tecido do ápice caulinar quando comparados com o controle, resultado este, também observado por Wang et al. (2014) em ápices caulinares de batata e Ding et al. (2008) para ápices meristemáticos de citros. Em espécies tropicais é de extrema importância o acúmulo de crioprotetores endógenos, como o açúcar, que aumentam a estabilidade das membranas, auxiliam na desidratação intracelular atuando na pressão osmótica e aumentam a tolerância à vitrificação com PVS2 reduzindo injúrias que causam morte celular após congelamento (Hoeskstra et al., 2001; Grapin et al., 2007; Sakai et al., 2008). Essa relação já foi relatada também por Reinhoud (1996) com tabaco, assim como para espécies tropicais tais como abacaxi e banana (Gamez-Pestrana et al., 2004; Martinez-Montero et al., 2005; 2012; Panis et al., 2005).

O uso de controles (NL-) neste tipo de trabalho é importante para que se tenha a noção do efeito da solução de vitrificação sobre os tecidos antes do congelamento. O tempo de exposição à solução é outro fator determinante para a obtenção de boas taxas de sobrevivência e recuperação e que deve estar bem adequado (Sakai et al., 2008). A escolha dos três tempos de exposição à solução de vitrificação usados neste trabalho, assim como a solução de PVS2 foi com base em trabalhos anteriores e em ensaios preliminares realizados no nosso laboratório, com resultados pouco eficientes para a solução de PVS3 (dados não apresentados). Gamez-Pestrana et al. (2004) ao utilizar PVS2 a 0 °C obtiveram resultados para as variedades MD2 e Puerto Rico, que variaram entre 40% a 60% de recuperação em uma amplitude de tempo que variou de 30 a 60 min de exposição, indicando um caminho que poderia ser seguido para outras variedades de abacaxi.

A interação significativa entre genótipos e tempo de exposição ao PVS2, tanto nos controles quanto após o congelamento, deixou evidente a elevada dependência genotípica e a necessidade de protocolos que possam atender melhor essas diferenças, provavelmente relacionadas

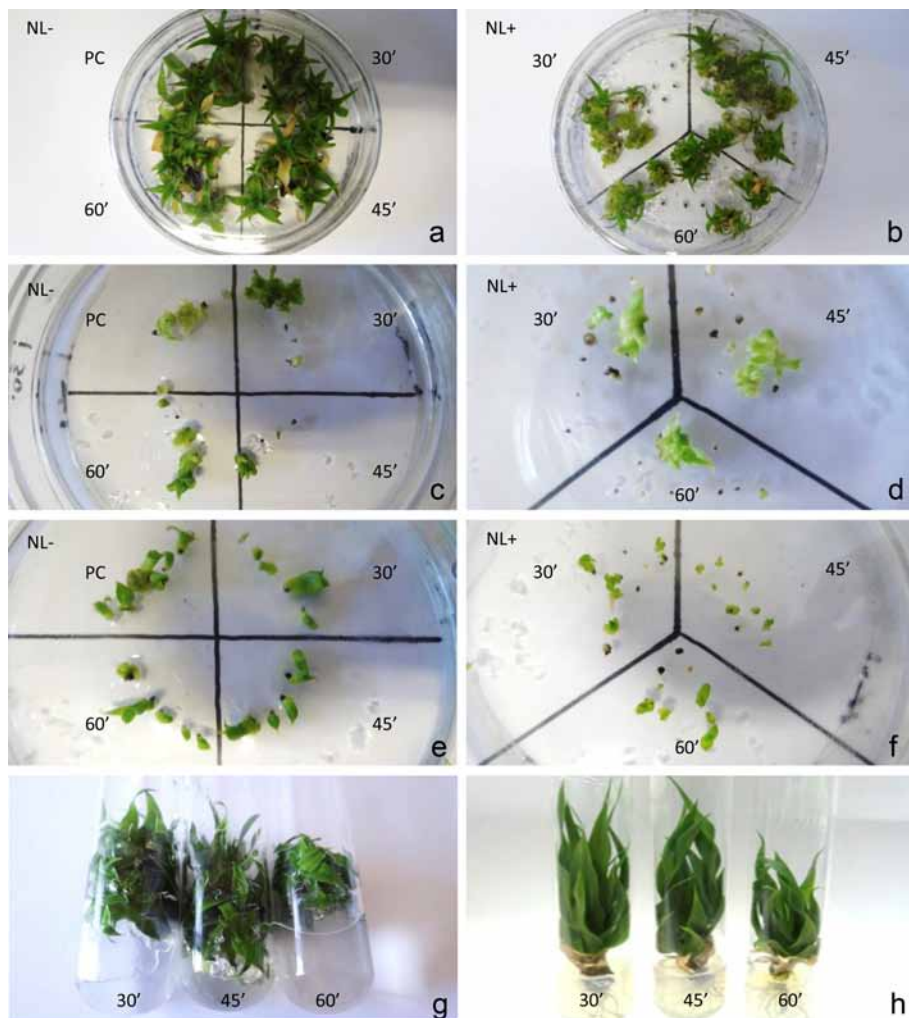
com a variação da tolerância destes genótipos à desidratação/vitrificação como comentado acima.

Para a grande maioria dos genótipos, após o congelamento, o tempo de exposição de 45 minutos foi considerado o melhor, ainda que para o BGA-128, um *A. comosus*. var. *bracteatus* tenha sido o tempo de 60 min. Para este genótipo, em particular, que apresentou os melhores resultados nos três tempos de exposição nos tratamentos controle, fica claro a possibilidade de se ampliar mais o tempo de exposição ao PVS2 para melhorar a eficiência nas taxas de sobrevivência.

Ainda assim, o resultado satisfatório em torno dos 45 min foi consolidado para a maioria das variedades, o que deixa evidente a importância das três repetições experimentais.

O avanço mais interessante deste trabalho foi que os bons resultados obtidos se devem ao uso da técnica de vitrificação em gotas, que possui um manejo muito mais simples que os protocolos anteriores para abacaxi. A eliminação da etapa de desidratação ou mesmo de desidratação/encapsulamento ou da osmoproteção diminui de forma significativa trabalho e risco, já que diminui também o manuseio com o tecido vegetal. Outro aspecto do uso desta técnica que pode ajudar a explicar esses resultados positivos para tantos genótipos é o método de descongelamento, que por ser ultrarrápido pode evitar a formação de cristais se comparado com o banho-maria; este, além de mais lento, demanda muitos cuidados para evitar contaminações por microrganismos dos explantes. Em países tropicais e em regiões de elevada temperatura e umidade, esse aspecto deve ser levado em consideração de forma contundente, pois os níveis de contaminação na fase de descongelamento usando banho-maria costumam ser bem elevados.

Outras experiências exitosas já foram reportadas a partir do método de vitrificação em gotas, como para *Musa*, *Rosa canina* e *Rosa rubiginosa*, ainda que a grande maioria inclua o procedimento de osmoproteção com glicerol e sacarose, etapa que também não foi utilizada neste trabalho (Panis et al., 2005; Pawlowska et al., 2014).



Fotos: Fernanda Vidigal Duarte Souza

Figura 2. Regeneração e desenvolvimento de ápices caulinares oriundos de tratamento controle e criopreservados nos diferentes tempos de exposição ao PVS2. Placa controle com plantas oriundas do pré-cultivo (PC) e dos três tempos de exposição ao PVS2 do abacaxi 'Imperial' (a); plantas regeneradas dos três tempos de imersão em PVS2 após congelamento (NL) do abacaxi 'Imperial' aos 150 dias após imersão em NL (b); Controles do *A. comosus* var. *microstachys* BGA-471 (c) e 45 dias após descongelamento (d); Controles do *A. comosus* var. *bracteatus* BGA-128 (e) e 45 dias após imersão em NL (f); Plantas da cultivar 'Imperial' (g) e 'Pérola' (h) oriundas da criopreservação em meio de multiplicação.

A Figura 3 evidencia o fluxograma das atividades que são realizadas para o estabelecimento das variedades botânicas no Banco Ativo de Germoplasma *in vitro* e criogenia. A escolha dos acessos a serem introduzidos leva em consideração a condição em que o mesmo se encontra no campo. Com o avanço da murcha do abacaxizeiro registrou-se a perda de várias plantas/ acessos nos últimos anos, o que vem demandando ações emergenciais para o resgate de acessos infectados. Outro critério utilizado é a baixa adaptação de alguns acessos às condições de campo estabelecidas, resultando em plantas debilitadas e com crescimento vegetativo comprometido.

A primeira etapa é a indexação da planta a ser introduzida para a detecção do vírus, que se realiza mediante a técnica de RT-PCR, utilizando-se oligonucleotídeos específicos para os tipos de PMWaV (Santos et al., 2011).

Se a planta estiver sadia, será micropropagada para a obtenção do número de mudas suficientes para constituírem o BAG *in vitro* (10 plantas/ acesso) e o criobanco (30 ápices caulinares/ acesso), considerando os testes de regeneração e estabilidade genética a serem realizados em intervalos de cinco anos.

Se a planta estiver infectada, deverá entrar na rota de limpeza a ser realizada por cultivo de ápice caulinar. Após nova indexação e confirmação da sanidade, entra na rota de multiplicação para posterior entrada nas duplicatas de segurança (BAG *in vitro* e criobanco).

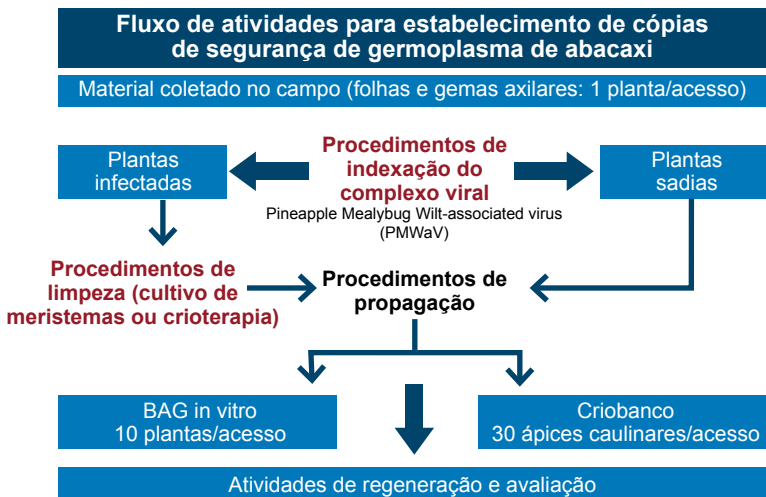


Figura 3. Fluxograma de atividade para o estabelecimento do Banco Ativo de Germoplasma *in vitro* e do Criobanco de abacaxizeiros da Embrapa Mandioca e Fruticultura.

Considerações finais

Esse trabalho é um registro do uso da técnica de vitrificação em gotas no processo de conservação de variedades silvestres e cultivadas de abacaxi por meio da criopreservação de ápices caulinares. Os resultados aqui apresentados comprovam o sucesso da vitrificação em gotas para o estabelecimento de criobancos de germoplasma deste gênero. Além do objetivo de criopreservação de germoplasma, pode ser usada também para a conservação de matrizes certificadas oriundas do programa de melhoramento genético de abacaxizeiro.

Agradecimentos

Agradecemos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/Embrapa e PNPd/ UFRB) pelas bolsas concedidas à E. H. Souza e P. A. Guerra, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo auxílio financeiro ao projeto. Agradecemos também a Dianne Skogerboe e Tracie Matsumoto pela disponibilização de material genético do National Clonal Germplasm Repository for Tropical Fruit - Hawaii, assim como o apoio técnico oferecido pela Dra. Maria Jenderek no National Center for Genetic Resources Preservation, USDA.

Referências

- BARRACO, G.; SYLVESTRE, I.; IAPICHINO, G.; ENGELMANN, F. Cryopreservation of *Limonium serotinum* apical meristems from in vitro plantlets using droplet-vitrification. **Scientia Horticulturae**, v. 130, n. 1, p. 309-313.
- BENSON, E. Cryopreservation theory. In: REED, B. (Ed.). **Plant Cryopreservation: a practical guide**. Springer-Verlag New York, 2008. p.15-32.
- CANTO, A. M. M. E.; SOUZA, F. V. D.; COSTA, M. A. P. C.; SOUZA, A. S.; LEDO, C. A. S.; CABRAL, J. R. S. Conservação *in vitro* de germoplasma de abacaxi tratado com paclitaxel. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 7, p. 717-720, 2004.
- CAPUANA, M.; LONARDO, S. D. In vitro conservation of chestnut (*Castanea sativa*) by slow growth. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 49, n. 5, p. 605-610, 2013.
- DING, F.; JIN, S.; HONG, N.; ZHONG, Y.; CAO, Q.; YI, G.; WANG, G. Vitrification–cryopreservation, an efficient method for eliminating *Candidatus Liberobacter asiaticus*, the citrus Huanglongbing pathogen, from in vitro adult shoot tips. **Plant Cell Reports**, v. 27, n. 2, p. 241-250, 2008.

ENGELMANN, F.; TAKAGI, H. (Eds). **Cryopreservation of tropical plant germplasm**. Current research progress and application. Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Tsukuba, Japan / International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. 2000.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Tratado Internacional sobre los Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura, 2005. Disponível em: < <http://www.fao.org/plant-treaty/overview/es/>>. Acesso em: 08/02/2018.

GAMEZ-PASTRANA, R.; MARTINEZ-OCAMPO, Y.; BERISTAIN, C. I.; GONZALEZ-ARNAO, M. T. An improved cryopreservation protocol for pineapple apices using encapsulation-vitrification. **Cryo Letters**, v. 25, n. 6, p. 405-414, 2004.

GONZALEZ-ARNAO, M. T.; MAEQUEZ, M.; URRRA, C.; MARTINEZ-MONTERO M.; ENGELMANN, F. Cryopreservation of apices from pineapple (*Ananas comosus*) *in vitro* plantlets. **CryoLetters**, v. 19, n. 6, p. 375-382, 1998.

GRAPIN, A.; DORION, N.; VERDEIL, J. L.; ESCOUTE, J. Histo-cytological changes in *Pelargonium* apices during the cryopreservation process: effect on the osmotic agent chosen for the preculture step. **Acta Horticulturae**, v. 270, p. 195-201, 2007.

GUERRA, P. A. Criopreservação e crioterapia de ápices caulinares para limpeza do vírus da murcha (PMWaV) em variedades silvestres do gênero *Ananas*. 2017. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, BA, 2017.

KAYA, E.; SOUZA, F.V.D. Comparison of two PVS2-based procedures for cryopreservation of commercial sugarcane (*Saccharum* spp.) germplasm and confirmation of genetic stability after cryopreservation using ISSR markers. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 53, n. 4, p. 410-417, 2017.

KAYA, E.; SOUZA, F.V.D.; GOKDOĞ, E. Y.; CEYLAN, M.; JENDEREK, M. M. Cryopreservation of citrus seed via dehydration followed by immersion in liquid nitrogen. **Turkish Journal of Biology**, v. 41, p. 242-248, 2017.

LIU, U.; BREMAN, E.; COSSU, T. A.; KENNEY, S. The conservation value of germplasm stored at the Millennium Seed Bank, Royal Botanic Gardens, Kew, UK. **Biodiversity and Conservation**, online. 2018.

MARTINEZ-MONTERO, M. E.; GONZALEZ-ARNAO, M. T.; ENGELMANN, F. Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm with Vegetative Propagation - Review of Sugarcane (*Saccharum* spp.) and Pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merrill) Cases. In: KATKOV, I. (Ed.). **Current Frontiers in Cryopreservation**, Intech, Croatia, 2012. p. 359-396.

MARTINEZ-MONTERO, M. E.; MARTÍNEZ, J.; ENGELMANN, F.; GONZALEZ-ARNAO, M. T. Cryopreservation of Pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr) Apices and Calluses. **Acta Horticulturae**, v. 666, p. 127-130, 2005.

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

NINOT, A.; HOWAD, W.; ARANZANA, M. J.; SENAR, S.; ROMERO, A.; MARIOTTI, R.; BALDONI, L.; BELAJ, A. Survey of over 4, 500 monumental olive trees preserved on-farm in the northeast Iberian Peninsula, their genotyping and characterization. **Scientia Horticulturae**, v. 231, p. 253-264, 2018.

PANIS, B. **Cryopreservation on *Musa* germplasma**. Practical Guide. Bioversity. International. Inter 2th edition. 2009. 47 p.

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

- POPOV, A. S.; POPOVA, E. V.; NIKISHINA, T. V.; VYSOTSKAYA, O. N. Cryobank of plant genetic resources in Russian Academy of Sciences. **International Journal of Refrigeration**, v. 29, n. 3, p. 403-410, 2006.
- REED, B. M. **Plant Cryopreservation: A Practical Guide**. New York, NY: Springer. 515 p. 2008.
- REINHOUD, P. J. Cryopreservation of tobacco suspension cells by vitrification. Doctoral **Thesis**, Leiden University, Institute of Molecular Plant Sciences, Leiden, the Netherlands. 1996.
- SAKAI, A.; HIRAI, D.; NIINO, T. Development of PVS-Based Vitrification and Encapsulation-Vitrification Protocols. In: REED, B. M. (Ed.). **Plant Cryopreservation: A Practical Guide**. Springer, Corvallis, 2008. p. 33-51.
- SANTOS, K. C.; ANDRADE, E. C.; SOUZA, F. V. D.; CARVALHO, H. L. Incidência e Prevalência do Pineapple Mealybug wilt Associated Virus em Germoplasma de Abacaxi. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 44., 2011, Bento Gonçalves. Anais... Tropical Plant Pathology, Brasília, DF, v. 36, p. 580-580, 2011.
- SAS Institute Inc. **SAS/Stat user's guide: statistics**. Version 9.2. Cary, NC, 2010.
- SCARIOT, A. O.; SEVILHA, A. C. Conservação *in situ* de recursos genéticos vegetais. In: NASS, L. L. (Ed.). **Recursos Genéticos Vegetais**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. p. 475- 509.
- SILVA, R. L.; FERREIRA, C. F.; LEDO, C. A. S.; SOUZA, E. H.; SILVA, P. H.; COSTA, M. A. P. C.; SOUZA, F. V. D. Viability and genetic stability of pineapple germplasm after 10 years of *in vitro* conservation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 127, n. 1, 123-133, 2016.
- SOUZA, E. H.; SOUZA, F. V. D.; COSTA, M. A. P. C.; COSTA JUNIOR, D. S.; SANTOS-SEREJO, J. A.; AMORIM, E. P.; LEDO, C. A. Genetic variation of the *Ananas* genus with ornamental potential. **Genet Resources and Crop Evolution**, v. 59, n. 7, p. 1357-1476, 2012.
- SOUZA, F. V. D.; CABRAL, J. R. S.; SOUZA, E. H.; SANTOS, O. N.; SANTOS-SEREJO, J. A.; FERREIRA, F. R. Caracterização morfológica de abacaxizeiros ornamentais. **Magistra**, v. 19, n. 4, p. 319-325, 2007.
- SOUZA, F. V. D.; KAYA, E.; VIEIRA, L. J.; SOUZA, E. H.; AMORIM, V. B. O.; SKOGERBOE, D.; MATSUMOTO, T.; ALVES, A. A. C.; LEDO, C. A. S.; JENDEREK, M. M. Droplet-vitrification and morphohistological studies of cryopreserved shoot tips of cultivated and wild pineapple genotypes. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 124, n. 2, p. 351-360, 2016.
- SOUZA, F. V. D.; SOARES, T. L.; CABRAL, J. R. S.; REINHARDT, D. H.; SILVA, J. L. C.; BENJAMIM, D. A. Slow-Grow Conditions for the *in vitro* conservation of pineapple germplasm. **Acta Horticulturae**, v. 702, p. 41-47, 2006.
- SOUZA, F.V.D.; KAYA, E.; VIEIRA, L. J.; SOUZA, A. S.; SANTOS, E. B.; ALVES, A. A. C.; ELLIS, D. Cryopreservation of Hamelin sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]] embryogenic calli using a modified aluminum cryo-plate technique. **Scientia Horticulturae**, v. 224, p. 302-305, 2017.
- WALTER, B.M.T.; CAVALVANTI, T.B.; BIANCHETTI, L.B.; VALLS, J.F.M. Coleta de germoplasma: relevância e conceitos básicos. In: WALTER, B.M.T.; CAVALCANTI, T.B. (Ed.). **Fundamentos para a coleta de germoplasma vegetal**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. p. 27- 42.
- WANG, B.; LI, J. W.; ZHANG, Z. B.; WANG, R. R.; MA, Y. L.; BLYSTAD, D. R.; KELLER, E. R.; WANG, Q. C. Three vitrification-based cryopreservation procedures cause different cryo-injuries to potato shoot tips while all maintain genetic integrity in regenerants. **Journal of Biotechnology**, v. 184, n. 1, 47-55, 2014.



Mandioca e Fruticultura

MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO

GOVERNO
FEDERAL