

**Alterações celulares em ápices caulinares e estabilidade genética de plantas de *Eucalyptus* submetidos à criopreservação**

**Cellular alterations in kaolinitic apices and genetic stability of *Eucalyptus* plants submitted to cryopreservation**

DOI:10.34117/bjdv6n12-042

Recebimento dos originais:09/11/2020

Aceitação para publicação:03/12/2020

**Chaiane Fernandes Vaz**

Doutoranda em Agronomia/Fisiologia Vegetal

Universidade Federal de Lavras, Lavras, Brasil/MG

Endereço: Universidade Federal de Lavras Caixa Postal 3037 - CEP: 37200-900 - Lavras/MG

E-mail: cha.fvaz@hotmail.com

**Marlúcia Souza Pádua**

Doutora em Biotecnologia Vegetal

Professora Universidade Estadual de Minas Gerais, Divinópolis, Brasil/MG.

Endereço: Av. Paraná, 3001. Jardim Belvedere - Divinópolis - MG. CEP: 35501-170

E-mail: marluciabio@yahoo.com.br

**Flávia Pereira Balieiro**

Doutora em Biotecnologia Vegetal

Assessora de Diretoria na EMBRAPPII, Associação Brasileira de Pesquisa e Inovação Industrial, Brasília/DF

Endereço Setor Bancário Norte, Quadra 1 Lote 28 Bloco I, CEP: 70040/913 – Brasília/DF

E-mail: f.balieiro@hotmail.com

**Leonardo Augusto Zebral Rodrigues**

Doutor em agronomia (Fisiologia Vegetal)

Universidade Federal de Lavras, Lavras, Brasil/MG

Endereço: Universidade Federal de Lavras Caixa Postal 3037 - CEP: 37200-900 - Lavras/MG

E-mail: leonardozebral@yahoo.com.br

**Luciano Vilela Paiva**

Doutor em agronomia (Fitotecnia)

Professor do Departamento de Química da Universidade federal de Lavras, Lavras, Brasil/MG

Endereço: Universidade Federal de Lavras Caixa Postal 3037 - CEP: 37200-900 - Lavras/MG

E-mail:luciano@dqi.ufla.br

**RESUMO**

O eucalipto é amplamente explorado, principalmente para produção de papel e na construção civil, o que gera uma alta demanda por mudas de eucalipto, tendo-se a necessidade de buscar técnicas biotecnológicas para aumentar a produtividade e conservar o germoplasma de híbridos elite. Dentre essas técnicas a criopreservação apresenta alto potencial para conservação em longo prazo de genótipos de interesse. Os objetivos deste trabalho foram desenvolver um protocolo de criopreservação por meio da técnica *droplet-vitrification* para o híbrido comercial *Eucalyptus grandis X Eucalyptus urophylla*, identificar alterações celulares nos ápices caulinares criopreservados, e verificar estabilidade genética das plantas. Ápices caulinares foram pré-cultivados em meio MS com sacarose a 0,2 M e 0,5 M, por 24 horas. Posteriormente, os ápices foram dispostos em papel alumínio contendo uma gota de PVS2 à 0 °C, antes da imersão em nitrogênio líquido (NL), em diferentes tempos (20, 40, 60, 80, 100 e 120 minutos). Os ápices foram reaquecidos por 10 minutos em solução de descarregamento a 25°C e transferidos para o meio de regeneração MS suplementado com 0,14 µM de BAP. Após 60 dias, avaliaram-se a sobrevivência, brotações e a estabilidade genética das plantas por citometria de fluxo. Os ápices caulinares nos tempos: recém excisados, submetidos à criopreservação, e após uma semana de recuperação foram coletados para análise de histologia e Microscopia Eletrônica de Varredura. O tempo de 60 minutos de PVS2 seguido de imersão em nitrogênio líquido proporcionou as maiores taxas de sobrevivência (66%), e número de brotações (6 brotos/ápice). O conteúdo estimado de DNA nuclear das plantas de eucalipto tratadas com PVS2 e criopreservadas não apresentaram diferenças estatísticas, quando comparado com as plantas do controle. As observações histológicas e ultraestruturais revelaram que o protocolo de *Droplet-vitrification* estabelecido com 60 minutos de exposição ao PVS2 causou menores danos celulares dos ápices caulinares.

**Palavras-chave:** Criolesão, Crioprotetores, Citometria de Fluxo, Microscopia Eletrônica.

**ABSTRACT**

Eucalyptus is widely exploited, mainly for paper production and in civil construction, which generates a high demand for eucalyptus seedlings, with the need to seek biotechnological techniques to increase productivity and preserve the germplasm of elite hybrids. Among these techniques, cryopreservation presents high potential for long-term conservation of genotypes of interest. The objectives of this work were to develop a cryopreservation protocol through the droplet-vitrification technique for the commercial hybrid *Eucalyptus grandis X Eucalyptus urophylla*, to identify cellular changes in the cryopreserved kaolinitic apices, and to verify genetic stability of the plants. The kaolinitic apices were pre-cultivated in MS medium with sucrose at 0.2 M and 0.5 M, for 24 hours. Later, the apices were arranged in aluminum foil containing a drop of PVS2 at 0 °C, before immersion in liquid nitrogen (NL), at different times (20, 40, 60, 80, 100 and 120 minutes). The apices were reheated for 10 minutes in a 25°C discharge solution and transferred to MS regeneration media supplemented with 0.14 µM of BAP. After 60 days, survival, sprouting and genetic stability of the plants were evaluated by flow cytometry. The kaolinitic apices at the time: newly excised, submitted to cryopreservation, and after one week of recovery were collected for histology analysis and Scanning Electronic Microscopy. The time of 60 minutes of PVS2 followed by immersion in liquid nitrogen provided the highest survival rates (66%), and number of sprouts (6 sprouts/apple). The estimated nuclear DNA content of the eucalyptus plants treated with PVS2 and cryopreserved did not present statistical differences when compared with the control plants. Histological and ultrastructural observations revealed that the Droplet-vitrification protocol established with 60 minutes of exposure to PVS2 caused less cellular damage to the kaolinitic apices.

**Keywords:** Cryolesion, Cryoprotectants, Flow Cytometry, Electronic Microscopy.

## 1 INTRODUÇÃO

A demanda por produtos oriundos de eucalipto, principalmente papel, celulose, carvão e matéria prima para a produção de aço tem resultado na necessidade de aumentar a produtividade e a qualidade das plantações, o que exige a utilização de genótipos com rápido crescimento, alto rendimento e resistentes a estresses bióticos e abióticos (Padayachee et al., 2009; Esteves et al., 2020). Com intuito de atender esta demanda, estratégias de melhoramento e propagação têm sido desenvolvidas, incluindo o melhoramento genético convencional associado às técnicas biotecnológicas como micropropagação e transformação genética (Grattapaglia, 2004; Watt et al., 2003). No entanto, tais estratégias requerem extensas práticas de seleção dos genótipos e testes de biosseguranças, sendo necessária a manutenção adequada dos genótipos potencialmente importantes, enquanto os testes de campos são realizados (Eldridge et al., 1993; Padayachee et al., 2009).

Em vista disso, técnicas alternativas de armazenamento têm sido requeridas para manutenção dos genótipos gerados pelo processo de melhoramento genético convencional e transformação genética (Padayachee et al., 2009; Panis et al., 2005). Nos dias atuais, a criopreservação é a opção com maior potencial para a conservação de germoplasma vegetal, uma vez que permite o armazenamento em longo prazo de células, tecidos ou órgãos de plantas em nitrogênio líquido à  $-196^{\circ}\text{C}$ , diminuindo drasticamente o metabolismo celular, fato que reduz os riscos de alterações genéticas e epigenéticas (Engelmann 2011; Panis et al., 2005; Keller 2008; Watt et al., 2000).

Dentre as várias técnicas disponíveis de conservação de germoplasma e criopreservação, a *droplet-vitrification* tem se destacado como a mais promissora para criopreservação de ápices caulinares (Silva et al., 2013). As taxas de resfriamento/aquecimento são ultrarrápidas, em razão do volume pequeno de solução de vitrificação em que os ápices são colocados, aumentando a probabilidade de se obter um estado vitrificado e evitar a recristalização (Sakai e Engleman, 2007; Panis et al., 2005). Porém, durante todo o processo, os explantes são submetidos a tensões fisiológicas, físicas, químicas que podem causar criolesões e predispor os tecidos, promovendo danos e perda de viabilidade com a progressão de cada etapa do protocolo (Benson e Bremner 2004; Wen et al. 2012; Panis et al., 2005).

Alguns destes danos celulares podem ser prevenidos pela utilização de soluções crioprotetoras. Essas soluções crioprotetoras podem conter sacarose, glicose, e polietilenoglicol, que auxiliam a remoção da água da célula sem a formação de cristais. Apesar das soluções crioprotetoras serem eficazes, a exposição prolongada ao glicerol e ao dimetilsulfóxido podem ser tóxicos para as células (Volk et al., 2007). Além disso, alterações na estabilidade genética já foram relatadas, devido às

reações químicas e fisiológicas, que ocorrem durante o processo, como a formação de radicais livres e danos moleculares (Panis et al., 2005).

Análises histológicas e ultraestruturais, durante as diferentes etapas do processo de criopreservação bem como a avaliação da estabilidade genética, após a obtenção das plantas de eucaliptos criopreservadas não foram descritas até o momento na literatura. Ainda mais, poucas pesquisas têm sido desenvolvidas com intuito de avaliar o efeito dos diferentes tratamentos da criopreservação no que se diz respeito às avaliações histocitológicas quanto os aspectos quantitativos e qualitativos de ápices caulinares em cada etapa do protocolo de *droplet-vitrification*. No entanto, entender e minimizar os danos celulares tais como, integridade celular, mudanças ultraestruturais na membrana celular, presença de núcleos condensados, nucléolos e citoplasma recolhido (plasmólise), durante o estabelecimento do protocolo pode auxiliar nas melhorias das técnicas de criopreservação para espécie (Yi et al., 2012; Barraco et al., 2014; Salehnia et al., 2002).

Os efeitos da criolesão sobre o genoma da planta são muitas vezes desconhecidos. No entanto, é de suma importância avaliações de integridade genética durante o processo de criopreservação e da regeneração do explante *in vitro*. As plantas criopreservadas podem sofrer a variações somaclonais, apresentando diferenças distintas nos seus perfis de genótipo e fenótipo, devido a alterações na estabilidade genética destas (Harding, 2004; Martín e González-Benito, 2005; Wang et al., 2014a,b).

O objetivo deste estudo foi desenvolver um protocolo de *droplet- vitrification* e identificar alterações celulares dos ápices caulinares para o híbrido comercial *Eucalyptus grandis X Eucalyptus urophylla*, durante processo de criopreservação e regeneração e verificar a estabilidade genética das plantas criopreservadas.

## **2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Material Vegetal**

Para a obtenção do material vegetal, segmentos nodais e gemas apicais *in vivo*, provenientes de mudas de um híbrido comercial de *Eucalyptus grandis X Eucalyptus urophylla*, foram desinfestados utilizando pastilhas de paraformoladeído, durante 50 minutos. Após esse intervalo, os explantes foram imersos em água destilada autoclavada, contendo 0,01 g L<sup>-1</sup> de ácido cítrico para evitar a oxidação, por 50 minutos. Os ápices caulinares foram excisados e inoculados em placas de petri contendo o meio MS basal onde permaneceram em contato com o meio durante 5 dias no escuro. Em seguida, foram transferidos para o meio de multiplicação composto pelo meio basal MS, suplementado com 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 5,70 µM de ácido indolacético (AIA) e 0,14 µM de 6-benzilaminopurina (BAP) e solidificado com 1,7g L<sup>-1</sup> de phytigel (Sigma). O pH foi aferido em 5,8 antes de autoclavagem a 121°C

a 1,0 atm, por 20 minutos. O material foi mantido na temperatura de  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ , fotoperíodo de 16/8 horas (luz/escuro) e irradiância de  $20\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  para a micropropagação de plantas *in vitro*.

### *Droplet-Vitrification*

A técnica de *Droplet-vitrification* foi realizada conforme Kaya et al. (2013) com adaptações. Os ápices caulinares ( $1-1,5\ \text{mm}^2$ ) foram excisados das plantas micropropagadas *in vitro* e pré-cultivados, por 24h em meio MS sólido suplementado com 0,2 M de sacarose, seguido por mais 24h em meio MS suplementado com 0,5M de sacarose, na ausência de luz. Transcorridos esse tempo, os ápices foram colocados em  $3\ \mu\text{L}$  da solução crioprotetora PVS2 (30% glicerol (w/v), 15% de etilenoglicol (w/v), 15% de dimetilsulfóxido (w/v), e 0,4 M de sacarose em meio MS) dispostas em tiras de papel de alumínio esterilizado (5 x 15 mm). Os explantes foram mantidos na solução crioprotetora em temperatura de  $0^{\circ}\text{C}$ ; durante 20, 40, 60, 80, 100 e 120 minutos.

Após a exposição de PVS2, as tiras de papel alumínio, contendo os ápices caulinares foram inseridas em criotubos de 1,5 ml dispostos dentro de criobox contendo nitrogênio líquido e, posteriormente, foram mantidas dentro do botijão de nitrogênio líquido por 60 minutos. Para o descongelamento, as tiras de folha de alumínio contendo os ápices caulinares foram retiradas dos criotubos e imediatamente imersas em solução de *recovery solution* (Meio MS líquido contendo 1,2 M de sacarose), em temperatura ambiente durante 10 minutos, e depois transferidas para o meio de regeneração. O meio de regeneração foi o MS suplementado com  $0,14\ \mu\text{M}$  de BAP.

Como controle, os ápices caulinares foram expostos ao PVS2 nos mesmos intervalos de tempo, porém não foram submetidos ao nitrogênio líquido. Posteriormente, os ápices também foram colocados em solução de *recovery solution* durante 10 minutos, e em seguida transferidos para o meio de regeneração.

Os explantes foram mantidos no escuro por três dias, para evitar a oxidação e, posteriormente, transferidos para fotoperíodo de 16/8 horas (luz/escuro) com temperatura de  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$  e irradiância de  $20\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Foram utilizados três repetições com dez ápices para cada tempo de tratamento, e o experimento foi repetido pelo menos três vezes. O experimento foi conduzido em delineamento experimental de blocos ao acaso com três repetições e as variáveis avaliadas foram percentagens de regeneração, após 30 dias de cultivo e número de brotos, após 60 dias.

### Análises histológicas

As observações dos ápices caulinares em diferentes fases do protocolo de criopreservação foram realizadas em lâminas histológicas, e foram selecionados apenas os tratamentos submetidos ao PVS2, que apresentaram as maiores e menores taxas de sobrevivência.

Para as análises histológicas, ápices caulinares de eucalipto foram fixados, após as diferentes etapas do processo de criopreservação: pré-cultura em meio contendo alta concentração de sacarose, exposição à solução PVS2 (60, 80 e 120 min) e congelamento. Ressalta-se que as coletas foram realizadas ao final de cada etapa e também após uma semana de inoculação em meio de regeneração.

As amostras foram fixadas em FAA 50% (solução de formaldeído, ácido acético glacial e álcool etílico 70%, em razão de 1:1:18 v/v) por três dias, e posteriormente foram conservados em álcool 70% até o momento da desidratação.

A desidratação foi realizada em série etílica (70%, 80%, 90% e 100%) por uma hora em cada percentagem e em 100% duas vezes por uma hora. Em seguida, as amostras foram deixadas durante a noite em quantidades iguais de resina e álcool 100%, e após foram infiltradas em resina pura, durante 24 horas. Os ápices foram emblocados em historesina Leica®, de acordo com o protocolo do fabricante. As amostras foram cortadas com espessura de 3µm em micrótomo rotativo e dispostas em lâminas de vidro e, em seguida, foram duplamente coradas com o reagente de ácido periódico de Schiff (PAS) e azul de toluidina na concentração de 0,1% e foram visualizadas em microscópio óptico Leica®.

As variáveis avaliadas foram: danos celulares, plasmólise, núcleos pinóticos e ruptura de membrana.

### **Análise histológica quantitativa**

As análises de plasmólise foram realizadas conforme Barraco et al. (2014), com adaptações, utilizando às mesmas amostras anteriores.

As observações foram realizadas em nove células de três camadas diferentes da região meristemática de três ápices: L1, L1-L3 e L7-L9 (Figura. 1). As imagens foram digitalizadas e analisadas mediante o software Image Pro-Plus (Version 4.5, Media Cybernetics, Silver Spring, EUA). A avaliação da plasmólise foi expressa em percentagem da superfície das células, medindo a proporção da superfície do citoplasma sobre a superfície da célula delimitada pela parede celular, calculada usando a fórmula:  $(\text{superfície do citoplasma} - 100 / \text{superfície da célula}) \times 100$ .

### **Microscopia eletrônica de Varredura**

Para microscopia eletrônica de varredura, avaliaram-se os ápices excisados (controle total), ápices expostos ao PVS2 nos tempos de 60, 80 e 120 minutos imersos em nitrogênio líquido e após uma semana de recuperação. Os ápices foram coletados e imersos em solução fixadora (Karnovisk) pH 7,2 por um período mínimo de 24 horas, lavados em tampão cacodilato de sódio por três vezes e pós-

fixados em tetróxido de ósmio 1% por 1 hora, à temperatura ambiente. Após esse período, foram lavadas por três vezes em água destilada e, em seguida, desidratadas em gradientes crescentes de acetona por 10 minutos cada (25%, 50%, 75%, 90% e 100% por três vezes). Posteriormente, o material foi levado ao aparelho de ponto crítico para completar a secagem, montado em *stubs* e coberto com ouro. Os espécimes foram observados no Microscópio Eletrônico de Varredura LEO Evo 40, segundo metodologia descrita por Alves (2004).

### Análise de citometria de fluxo

O conteúdo relativo de DNA foi avaliado em plantas *in vitro* de eucalipto não criopreservadas (tratamento controle total), expostas ao PVS2 sem posterior imersão em nitrogênio líquido (tratamento NL-) e criopreservadas (NL+). Para liberação dos núcleos, utilizou-se aproximadamente 30 mg de folhas jovens de *Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus urophylla* e de *Solanum lycopersicum* L. cv. Stupické (padrão de referência interno) que foram triturados em placa de Petri contendo 1 mL de tampão Marie gelado (50 mM glucose; 15 mM NaCl; 15 mM KCl; 5 mM Na<sub>2</sub>EDTA; 50 mM citrate de sódio; 0.5% Tween 20; 50 mM HEPES (pH 7.2); 1% (m/v) polyvinylpyrrolidone-10). A suspensão de núcleos foi aspirada com auxílio de uma pipeta plástica e filtrada através de uma malha de 50 µm e, posteriormente, corados pela adição de 25 µL de iodeto de propídeo (1 mg/1mL). Para cada amostra, 10 mil núcleos foram analisados utilizando-se uma escala logarítmica. A análise foi realizada no citômetro FACSCalibur (Becton Dickinson), os histogramas obtidos com o software Cell Quest e analisados estatisticamente no software WinMDI 2.8.

Para este experimento, utilizou-se como repetição 10 plantas para cada tratamento, O conteúdo de DNA nuclear (pg) das plantas foi estimado utilizando-se a razão entre as intensidades de fluorescência dos núcleos G1 (núcleos que estão na fase G1 da Interfase) do padrão de referência e dos núcleos G1 da amostra, multiplicando-se esta razão pela quantidade de DNA do padrão de referência (1,96 pg).

$$\text{Amostra, 2C} = \frac{\text{Canal do pico G1 da amostra}}{\text{DNA}} \times \frac{\text{Conteúdo 2C de DNA}}{\text{Canal do pico G1 de } \textit{Pisum sativum} \text{ do padrão (1,96 pg)}}$$

### Aclimatização

Inicialmente, 30 plantas de cada tratamento - controle total, expostas ao PVS2 sem imersão em nitrogênio líquido (NL-) e criopreservadas (NL+) com seis meses de idade, foram transferidas para o meio de enraizamento, contendo ¼ de sais do meio MS, 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de pantotenato de cálcio, 0,5 mg.L<sup>-1</sup> bioatina e 0,1 mg.L<sup>-1</sup> de ácido indolbutírico (AIB) (Murashige e Skoog, 1962; Muhammad et al.

2011), na qual permaneceram por 30 dias. Posteriormente, foram levadas para casa de vegetação, onde as raízes foram lavadas em água corrente, para retirada do resíduo do meio de cultivo, e as plantas transplantadas para copos plásticos de 700 ml, contendo substrato comercial de casca de pinus. Colocar que foi adicionado o saquinho plástico

Ao final de 60 dias avaliou-se a sobrevivência das plantas, e as que sobreviveram foram consideradas aclimatizadas.

### **Análise estatística**

Para percentagem de regeneração, número de brotações e citometria de fluxo, os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância com o uso do software SISVAR (Ferreira 2011).

Para percentagem de plasmólise, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade, utilizando o software SISVAR (Ferreira 2011).

## **3 RESULTADOS**

### ***Droplet-Vitrification***

Os ápices submetidos à exposição de PVS2 por 60 minutos e subsequente imersão em nitrogênio líquido por uma hora apresentaram maiores taxas de regeneração (66%), quando comparados com os tempos de 20, 40, 80, 100 e 120 minutos que apresentaram taxas de regeneração de 18%, 39%, 6%, 16% e 5%, respectivamente (Tabela 1). O mesmo tratamento que proporcionou a maior taxa de regeneração (PVS2 por 60 minutos), também foi o que possibilitou a maior percentagem de brotações (6,0) por explante, com desempenho semelhante ao tratamento controle total (Tabela 1). As plantas regeneradas *in vitro* a partir dos explantes submetidos a este tratamento não diferiram visualmente em termos de desenvolvimento em relação ao controle total (Figura 2d; e).

### **Análises histológicas qualitativas**

Os ápices controle total apresentaram na zona meristemática, células pequenas com formato isodiamétrico, núcleos circulares e nucléolos visíveis. Observou-se que algumas células da região meristemáticas ficaram plasmolisadas, provavelmente em decorrência da excisão do ápice. Ápices pré-cultivados em sacarose a 0,2 M e a 0,5 M de sacarose, por 24 horas cada, apresentaram na zona meristemática poucas células plasmolisadas e vacuolizada como resposta ao meio osmótico submetido (Figura 3). Nos ápices expostos ao PVS2 por 60 minutos (sem imersão em NL), algumas células da



zona meristemática ficaram mais plasmolisadas, com aumento da vacuolização, e algumas dessas células apresentaram núcleos circulares e com nucléolos claramente visíveis (Figura 4a). Já os ápices expostos ao PVS2 por mais tempo (80 minutos sem imersão em NL), apresentaram na zona meristemática núcleos pinóticos indicando possível necrose do tecido e os nucléolos não foram visualizados (Figura 4b). O mesmo foi observado no tempo de exposição do agente crioprotetor PVS2, por 120 minutos (sem imersão em NL), devido ao estresse superior algumas células na zona meristemática foram rompidas (extravasamento do conteúdo citoplasmático) (Figura 4c).

Nos ápices expostos ao PVS2 por 60 minutos e imersos em nitrogênio líquido, as células apresentaram núcleos visíveis, porém próximo aos primórdios foliares e na zona meristemática observou-se danos à parede celular (Figura 4d). Já os ápices expostos ao PVS2 por 80 minutos imersos em nitrogênio líquido apresentavam algumas células na zona meristemática com núcleos pinóticos, danos na parede celular e em algumas regiões dos primórdios foliares, ocorrendo morte celular. Houve em algumas células desprendimento da membrana citoplasmática o que significa que estavam altamente plasmolisadas (Figura 4e). Nos ápices expostos ao PVS2 por 120 minutos imersos em nitrogênio líquido também apresentaram na zona meristemática núcleos pinóticos e células plasmolisadas (Figura 4f).

Ápices expostos ao PVS2 por 60 minutos, após uma semana de recuperação apresentaram células na zona meristemática em ativa divisão celular com núcleos e nucléolos bem visíveis (Figura 4g; h). Já para os ápices submetidos à exposição de PVS2 por 120 minutos as células apresentaram núcleos pinóticos sem nucléolos visíveis e com células plasmolisadas (Figura 4i). Nos ápices expostos ao PVS2 por 60 minutos e imersos em nitrogênio líquido recuperado após uma semana, apresentaram sinais claros de regeneração, a zona meristemática estava em divisão celular ativa, com poucas células plasmolisadas núcleos e nucléolos visíveis (Figura 4j). Já para os ápices expostos ao PVS2 por 80 e 120 minutos e imersos em nitrogênio líquido, após uma semana de regeneração apresentaram núcleos pinóticos e células altamente plasmolisadas (Figura 4l; m).

### **Análises quantitativa**

Ápices expostos ao tratamento com PVS2 no tempo de 120 minutos tiveram percentagens significativas de plasmólise nas camadas analisadas, L1, L1-L3, L7-L9 (6%, 7,9% e 10,3%, respectivamente), quando comparado aos tempos de 60 e 80 minutos (Tabela 2).

Ápices expostos ao tratamento com PVS2 nos tempos de 60, 80 e 120 minutos após uma semana não apresentaram plasmólise na camada L1 e apresentaram baixas percentagens de plasmólise nas

camadas L1-L3 de 0,9%, 1,2% e 2,2% respectivamente. No tempo de 80 minutos de PVS2 as células apresentaram maiores taxa de plasmólise (17,6%) nas camadas L7-L9 (Tabela 2).

Ápices expostos ao tratamento com PVS2 por 60 minutos (Imersos em NL) apresentaram menores taxas de plasmólise em todas as camadas analisadas (2,2%, 3,13% e 2,1 % nas camadas L1, L1-L3, L7-L9 respectivamente), quando comparado com os demais tratamentos (Tabela 2). Após uma semana de recuperação os ápices expostos ao tratamento com PVS2 por 60 minutos (imersos em NL) não apresentaram células plasmolisadas em nenhuma das camadas analisadas, quando comparado com os demais tratamentos, sendo o tratamento de 120 minutos o que maior apresentou plasmólise em todas as camadas analisadas (20,3%, 12,83% e 9,8% respectivamente) (Tabela 2).

### **Microscopia eletrônica de varredura**

Análises em microscópio eletrônico de varredura de ápices caulinares excisados, que não foram submetidos ao agente crioprotetor e à criopreservação sem o crioprotetor PVS2, apresentaram-se intactos com presença de células túrgidas sem nenhum tipo de fissura em sua estrutura (Figura 5a; b).

Já os ápices caulinares expostos ao PVS2 por 60 minutos imersos em nitrogênio líquido, mostraram uma menor turgidez celular do que os ápices controle, apresentando pequenas fissuras em sua estrutura (Figura 5c). Após, uma semana de recuperação, os ápices apresentaram algumas células com menor turgidez em sua estrutura (Figura 5d), porém uma maior quantidade de células intactas indicaram a recuperação de tecidos e a possibilidade de regeneração.

Os ápices expostos ao PVS2, durante 80 e 120 minutos, seguidos de imersão em nitrogênio líquido, e posteriormente uma semana de recuperação em meio de regeneração apresentaram células murchas e danificadas em toda sua estrutura (Figura 5e; f; g; h).

### **Análise de citometria de fluxo**

O conteúdo estimado de DNA nuclear das plantas de eucalipto em ambos os tratamentos (NL- e NL+), não apresentaram diferenças estatísticas (Figura 6). As amostras do controle total (plantas não criopreservadas), apresentaram valores menores de coeficiente de variação (CV= 0,71%), o que garante maior confiabilidade na estimativa do DNA das plantas submetidas a este tratamento. As plantas expostas ao PVS2 (NL-) e plantas criopreservadas (NL+) apresentaram valores maiores de coeficiente de variação (CV= 0,83% e 0,94% respectivamente) (Tabela3). Os valores dos coeficientes de variação estão de acordo com os valores encontrados na literatura para estimativas com boa precisão, onde é relatado que o valor deva ser 1- 2% (Marie & Brown, 1993; Ulrich & Ulrich ,1991).

## **Aclimatização**

As plantas criopreservadas foram aclimatizadas com sucesso na casa de vegetação e as taxas de sobrevivência foram de 90%. A planta criopreservada enraizada e após a aclimatização apresentaram aspectos normais (Figura 2f).

## **4 DISCUSSÃO**

A *Droplet-vitrification* é uma técnica relativamente recente e promissora para a criopreservação de ápices caulinares para inúmeras espécies de plantas (Grapin et al. 2011, Keller et al. 2008; Panis et al., 2005). Esta técnica permite altas taxas de resfriamento e aquecimento, que é fundamental para evitar a formação de cristais de gelo (Keller et al. 2008).

O sucesso da técnica baseia-se na desidratação do explante de forma eficiente e controlada, evitando lesões por toxicidade química ou estresse osmótico em excesso, durante o tratamento (Toshikazu & Akira, 2003; Volk & Walters 2006). De fato, um dos desafios para que criopreservação de ápices caulinares de eucalipto, seja bem sucedida, consiste na tolerância dos explantes ao processo de desidratação (Padayachee et al. 2009; Kaya et al. 2013). O uso de pré-tratamento com sacarose é importante, uma vez que pode aumentar a tolerância dos ápices caulinares à desidratação, e subsequente resfriamento em nitrogênio líquido, através da produção endógena de vários compostos com propriedades crioprotetoras (frutose e sacarose, prolina e betaínas) (Silva et al. 2013). Além disso, a desidratação causada pela exposição dos tecidos à PVS2 é um passo essencial na criopreservação e crítica para a sobrevivência e a recuperação do tecido (Heringer et al., 2013). Portanto, o tempo de exposição PVS2 deve ser adaptado para cada cultura e pode variar entre as cultivares (Chua e Normah 2011; Condello et al. 2011; Souza et al., 2016).

No presente estudo, observou-se o efeito positivo na taxa de regeneração e no número de brotações, quando os ápices caulinares de eucalipto foram pré-cultivados em 0,2 M de sacarose por 24 horas, seguidos de 0,5 M de sacarose e tratados com PVS2 por 60 minutos. As plantas apresentaram taxas de 66% de regeneração e 57 brotações, similares ao comportamento das plantas controle total, o que permitiu observar que o processo de regeneração foi ideal após a criopreservação e promoveu a recuperação de maior quantidade de células vivas conforme verificado nas análises histológicas e ultraestruturais.

Kaya et al. (2013) verificaram que a utilização de concentrações superiores de sacarose (0,25M e 0,625M) e tratamento com PVS2 por 60 minutos também foram positivas para a regeneração para dois clones (452 e 455) do híbrido *E. grandis* X *E. urophylla*. No entanto, com taxas de regeneração de 46% e 58%, ou seja, um pouco inferiores às obtidas no presente trabalho. Estes resultados indicam que

o tempo de 60 minutos de exposição ao PVS2 é o ideal para o híbrido *E.grandis X E.urophylla*, proporcionando a desidratação e osmoproteção necessária para manter a viabilidade celular durante a imersão em nitrogênio líquido e prevenir os tecidos de danos irreversíveis às membranas, devido a possíveis efeitos de cristalização que podem ocorrer no processo.

A maior taxa de regeneração do híbrido *E.grandis X E.urophylla*, observada neste trabalho, pode estar associada à utilização de menores concentrações de sacarose no pré-cultivo, antes da exposição ao PVS2. A sacarose durante o pré-cultivo é importante para promover a redução do conteúdo de água dos explantes, por causar a desidratação das células, promovendo a proteção das membranas celulares durante o resfriamento a formação de cristais (Panis et al.,1996; Burritt et al., 2008; Padayachee et al., 2009). Porém, às altas concentrações de sacarose podem ser prejudiciais para algumas espécies e genótipos de plantas, pois pode promover o aumento drástico da osmolaridade, resultando no choque osmótico e, conseqüentemente os ápices podem não retomarem seu crescimento (Pârques et al. 2002; Kaya et al. 2013). Estudos com ápices caulinares do híbrido *E. grandis X E. urophylla* submetidos a concentrações de sacarose no pré-cultivo, entre 1M e 1,2M, demonstram que estes, são mais sensíveis a altas concentrações de sacarose, não proporcionando subsequentemente regeneração das plantas (Kaya et al. 2013).

Aa taxa de sobrevivência pode estar relacionada ao genótipos. Em estudos de criopreservação, comtreze clones de eucaliptos obtiveram as maiores taxas de sobrevivência, quando os ápices foram expostos ao PVS2 por 60 minutos, porém a taxa de sobrevivência variou de 84% a 34 % entre os diferentes genótipos de eucaliptos estudados (Kaya et al. 2013). Resultados similares encontrados neste trabalho, onde maiores tempos de exposição ao PVS2 (80, 100 e 120 minutos), não foram satisfatórios para criopreservação do híbrido *E.grandis X E. urophylla*, uma vez que a taxa de regeneração apresentou uma redução significativa, sendo o tempo de 60 minutos também favorável a criopreservação e posterior regeneração dos ápices caulinares. A exposição prolongada em PVS2 pode promover o estresse osmótico, aumentando a viscosidade celular, ocasionando danos por toxicidade química ou estresse osmótico severo (Sakai et al. 2008; Reed et al. 2008; Yil et al. 2012).

O tempo de tratamento com PVS2 varia consideravelmente entre as espécies, mas em geral, longos períodos de exposição podem ser letais para as células. As membranas celulares da planta excessivamente desidratadas podem sofrer mudanças estruturais, estresse oxidativo e desnaturação de proteínas (Heringer et al., 2013 Le e McQueenMason 2006). Estudos de criopreservação em ápices caulinares de *Capparis spinosa*, demonstraram que o tempo de exposição em PVS2 acima de 80 minutos foram prejudiciais para taxa de regeneração, com um decréscimo significativo de 70% em

relação ao tratamento controle (Shatnawi, 2011). A determinação do tempo, no qual os explantes são tratados com as soluções crioprotetoras (PVS2), é de extrema importância, uma vez que determina a extensão da desidratação celular e a quantidade de componentes que irão penetrar na célula (Chen et al. 2011; Souza et al., 2016).

Este é o primeiro estudo até o presente momento a analisar as alterações ultraestruturais e histológicas de ápices caulinares de Eucaliptos durante o processo de *droplet-vitrification*. Estudos de análises histológicas e ultraestruturais de ápices caulinares criopreservados de batata, *Eutrema japonicum* (Miq.) Koidz, banana, Alcachofra de Jerusalém, demonstraram que o método de *droplet-vitrification* era menos prejudicial para os ápices caulinares do que outras técnicas de criopreservação (Matsumoto 2001, Wang et al., 2014).

Em nosso estudo as observações histológicas de ápices caulinares de *E. grandis* X *E. urophylla* submetido ao tempo de 60 minutos de exposição ao PVS2 sem e com imersão no nitrogênio, permitiram a verificar que as células mantiveram sua integridade, sem danos severos e as três camadas da zona meristemática analisada apresentaram baixas taxas de plasmólise e, após uma semana em meio de regeneração, as células apresentavam ausência de plasmólise. Esse resultado pode ser explicado devido ao equilíbrio progressivo entre os compartimentos extracelulares e intracelulares (Barraco et al., 2014).

As alterações encontradas neste estudo corroboram com às alterações relatadas para ápices caulinares de *Helianthus tuberosus*, que, após a exposição ao LN às células nas primeiras camadas do meristema (L1-L3), apresentaram núcleos estruturalmente intactos, paredes celulares, e não foi observado células altamente plasmolisadas apenas nas células diferenciadas do meristema, durante os tratamentos com crioprotetores (Jin-Mei et al., 2017).

Neste trabalho ápices expostos aos tempos de exposição ao crioprotetor (PVS2) de 80 e 120 minutos sem imersão em NL, imersos em nitrogênio líquido, e após uma semana de recuperação apresentaram células plasmolisadas e núcleos pinóticos, o que provavelmente tenha interferido na retomada da regeneração dos ápices caulinares. A tolerância à desidratação pode estar relacionada com a capacidade de retomada ao estado normal, devido à ausência de células plasmolisadas (Bachiri et al. 2000; Volk et al. 2007). A presença de núcleos pinóticos pode ser devido à condensação da cromatina, sendo comum essa reação em células sob condições de estresse. A cromatina é bloqueada em uma configuração inacessível, impedindo a transcrição genômica, afetando o crescimento celular (Berjak et al. 2000; Eberharter e Becker 2002). Porém, durante condições de estresse, a paralisação do

crescimento celular pode ser vantajosa para os tecidos, permitindo, que as plantas possam superar o estresse temporário (Jarillo et al. 2009).

O aparecimento de núcleos pinóticos, durante o processo de criopreservação, após o tratamento de osmoproteção e imersão no nitrogênio líquido, também foi relatado para espécies de inhame e orquídeas, e os autores observaram, após uma semana em meio de cultura para regeneração os núcleos pinóticos não foram mais observados, sugerindo que a picnose pode ser um fenômeno reversível em células vegetais (Barraco et al. 2014; Rahmah et al. 2015). Já no presente estudo, verificou-se a permanência dos núcleos pinóticos, quando os ápices foram submetidos a altos tempos de exposição ao crioprotetor, posterior imersão em nitrogênios líquidos, e submetidos ao meio de regeneração por uma semana.

Neste estudo os ápices submetidos ao tempo de 120 minutos de exposição ao PVS2, sem imersão em nitrogênio líquido, foi observado um ruptura da membrana plasmática, levando o extravasamento do conteúdo citoplasmático em algumas células na região meristemática. A velocidade e extensão do vazamento citoplasmático podem estar correlacionadas positivamente ao grau de sensibilidade à desidratação. A desidratação ocasiona alterações na integridade estrutural e funcional da membrana, bem como alterações nas suas propriedades físico-químicas, ocasionando mudanças no comportamento e na composição relativa da membrana, com perda parcial da sua semi-permeabilidade (Crowe et al. 1990, 1997, Zhang et al., 2017).

Análises ultraestruturais da superfície das amostras através de microscopia eletrônica de varredura corroboram com os resultados obtidos na histologia, demonstrando danos severos nas células do ápice, quando expostos a altos tempos de exposição ao PVS2 e posterior imersão em nitrogênio líquido. Estes proporcionaram fissuras e uma menor turgidez, quando comparado com o controle total e ao tempo de exposição ao PVS2 por 60 minutos. Este resultado pode ser explicado pelo aumento do estresse hídrico, que promove a perda de turgidez e posterior contração das células (Vertucci e Farrant, 1995). A contração celular pode ser irreversível, comprometendo a integridade da membrana (Vertucci e Farrant, 1995).

A criolesão, observada neste trabalho, nos tratamentos de maior tempo de exposição ao crioprotetor (colocar o tempo), e posterior imersão em nitrogênio líquido, pode estar relacionada à formação de cristais de gelo intracelular, ao fluxo de água para fora da célula (desidratação), e ao aumento da concentração intracelular de solutos (Aguar et al. 2012).

O processo de criopreservação, causam tensões como exemplo, a desidratação e a pressão osmótica, durante o congelamento, que podem resultar na variação genética (Hazubska-Przbyl et al.

2010). A avaliação da integridade genética, após o congelamento, é essencial para verificar se a criopreservação pode ser realizada com sucesso para garantir o armazenamento íntegro de germoplasma de espécies vegetais, sem que as mesmas sofram qualquer tipo de variação genética (Engelmann 2004; Harding 2004). Em sementes de *bletilla striata*, calos embriogênicos de *Gingko biloba*, em ápices de *Chrysanthemum morifolium* e sementes de *Oncidium flexuosum* a criopreservação não induziu qualquer alteração no conteúdo relativo de DNA de amostras criopreservadas (Galdiano et al. 2011; Hirano et al. 2005; Lee et al. 2011; Popova et al. 2009).

Em conclusão, a técnica *Droplet-vitrification* foi eficiente para criopreservar os ápices caulinares de *Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus urophylla*, e a exposição ao crioprotetor (PVS2) por 60 minutos proporcionaram as maiores taxas de regeneração e formação de novas brotações. As análises histocitológicas e ultraestrutural permitiram determinar as alterações ocorridas nos diferentes passos da técnica de *Droplet-vitrification*, verificando que o tratamento com PVS2 por 60 minutos e posterior imersão em nitrogênio líquido não promoveram danos irreversíveis. A integridade do DNA das plantas criopreservadas e o sucesso na aclimatização das plantas em casa de vegetação nos permite inferir que a criopreservação foi bem sucedida. É necessária uma maior investigação para compreender completamente as respostas citológicas, bioquímicas e moleculares das células à criopreservação.

Fig. 1 Corte histológico de ápices caulinares de Eucalipto mostrando as três zonas: L1 constituído de nove células localizadas na camada externa do meristema; L1-3 constituído de nove células divididos igualmente entre as camadas 1, 2 e 3 do meristema; L7-9 constituído por nove células dividido igualmente entre as camadas 7, 8 e 9 abaixo da superfície do meristema, onde foram realizadas as medições da superfície das células, para verificação de plasmólise.

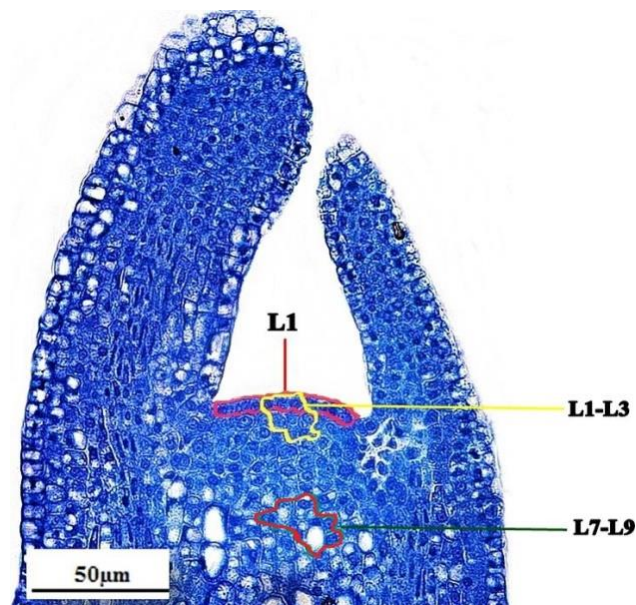


Tabela 1 Percentagem de regeneração e número de brotações de *E. grandis* X *E. urophylla*, expostos em diferentes tempos de PVS2 sem (NL-) ou com a imersão em nitrogênio líquido (NL+)

PVS (min)	Regeneração (%)		Brotações	
	NL (-)	NL (+)	NL (-)	NL (+)
0	100,0 aA	0,0 cB	5,7 aA	0,0 cB
20	83,0 aA	18,0 cB	1,07 dA	1,4 bA
40	70,0 aA	38,0 bB	1,8 cA	1,07 bB
60	77,0 aA	66,0 bA	6,7 aA	5,7 aB
80	60,0 bA	16,0 cB	0,67 dA	0,93 bA
100	60,0 bA	5,0 cB	1,1 dA	0,3 cB
120	50,0 bA	5,0 cB	0,7 dA	0,1 cB

Médias seguidas por letra minúscula iguais na coluna e maiúscula na linha dentro de cada variável pertencem ao mesmo grupo e não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Fig. 2 (a) Ápice excisado de 1,5 mm. (b) Aspecto visual das plantas controle total após 1 semana (c) Aspecto visual das plantas expostas a 60 minutos de PVS2 seguido de imersão NL após 1 semana. (d) Aspecto visual das plantas controle total após 30 dias. (e) Aspecto visual das plantas expostas a 60 minutos de PVS2 seguido de imersão NL após 30 dias. (f) Aspecto das plantas criopreservadas após 60 dias na casa de vegetação.

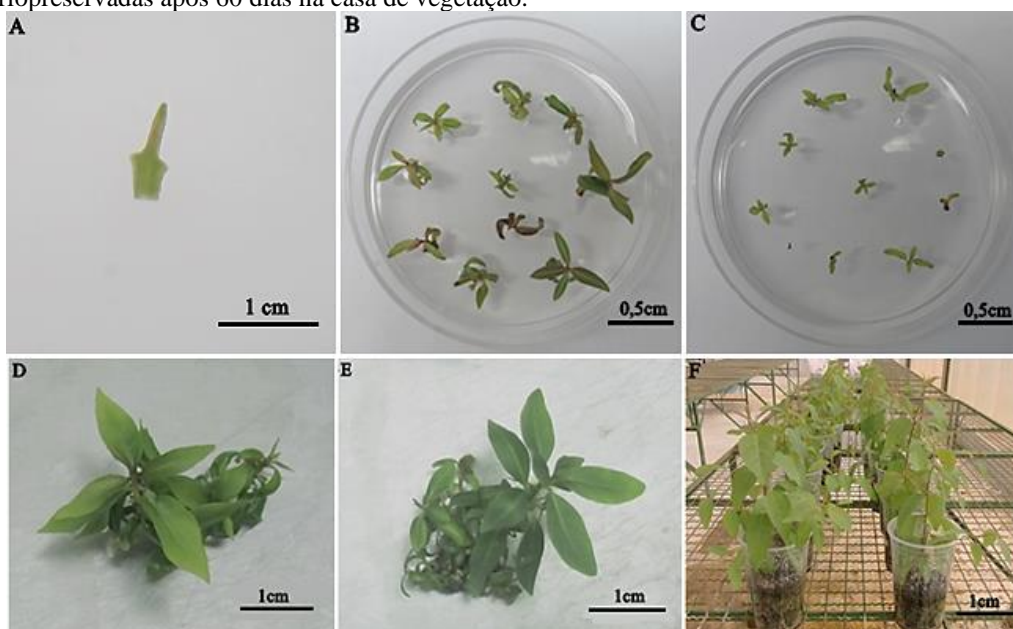




Fig. 3 Histologia de ápices excisados de *E. grandis* X *E. urophylla*. (a) Ápices que não passaram por nenhum tratamento (controle total). (b) Ápice depois da pré-cultura de sacarose a 0,2 M seguido de 0,5M por 24horas cada. Observa-se plasmólise (PI) na região meristemática (seta)

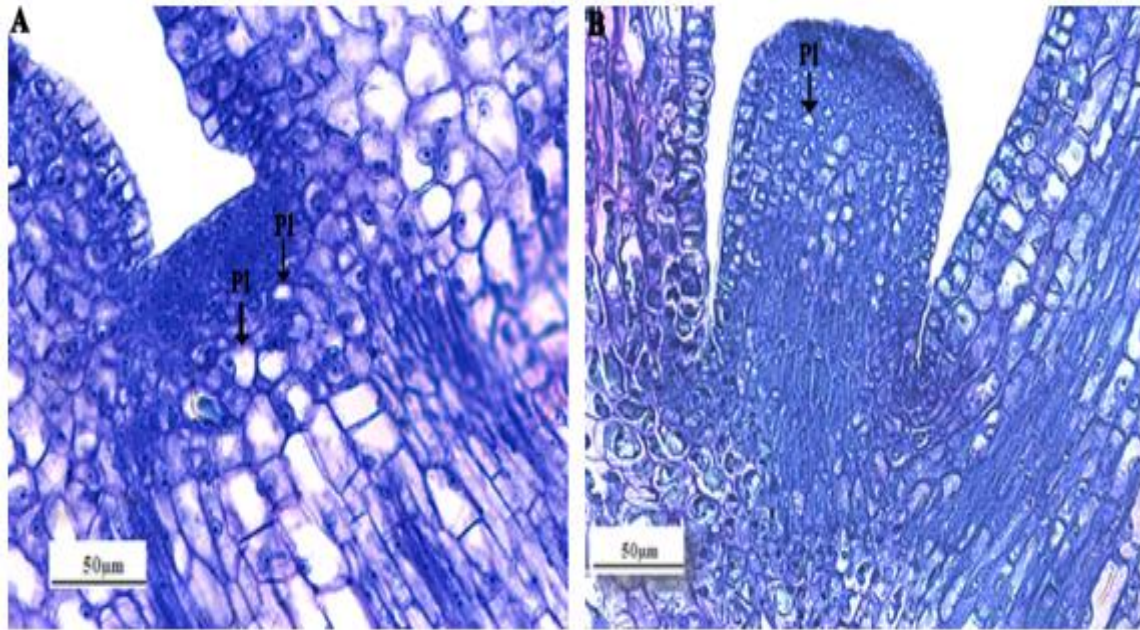


Fig. 4 Histologia de ápices de *E.grandis* X *E.urophylla*. (a) 60 minutos de exposição ao PVS2; (b) 80 minutos de exposição ao PVS2; (c) 120 minutos de exposição ao PVS2; (d) 60 minutos de exposição ao PVS2 + NL; (e) 80 minutos de exposição ao PVS2 + NL; (f) 120 minutos de exposição ao PVS2 + NL; (g) 60 minutos de exposição ao PVS2 uma semana de recuperação; (h) 80 minutos de exposição ao PVS2 uma semana de recuperação; (i) 120 minutos de exposição ao PVS2 uma semana de recuperação; (j) 60 minutos de exposição ao PVS2 + NL uma semana de recuperação; (l) 80 minutos de exposição ao PVS2 + NL uma semana de recuperação; (M) 120 minutos de exposição ao PVS2 + NL uma semana de recuperação. PI = Plasmólise; DC= Dano celular; PN= núcleos pinóticos.

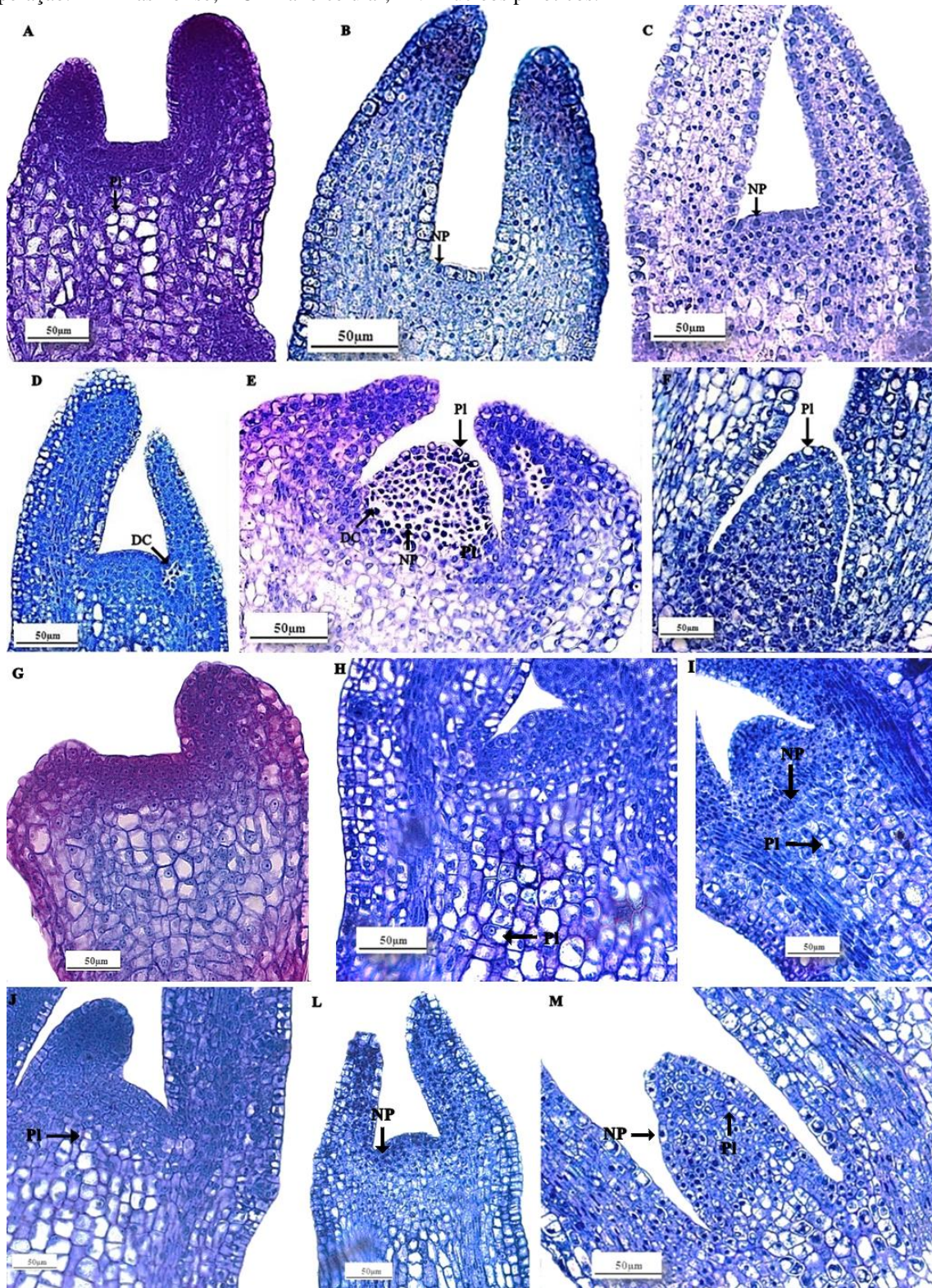


Tabela 2 Avaliação de plasmólise (Porcentagem total da área das células) em diferentes camadas de células na zona meristemática dos ápices de *E. grandis* X *E. urophylla*, quando logo após a exposição ao PVS2 e após 1 semana de recuperação em três tempos (60, 80 e 120 minutos)

PVS	Após exposição			Após recuperação		
	NL (-)			NL (+)		
	L1	L1-L3	L7-L9	L1	L1-L3	L7-L9
60	2,7 b	2,7 b	0 b	0,0 a	0,9 b	0,8 b
80	1,5 b	7,9 a	8,5 a	0,0 a	1,2 a	17,6 a
120	6,0 a	2,5 b	10,33 a	0,0 a	2,2 a	0,0 b
NL (+)						
60	2,2 c	3,13 b	2,1 c	0,0 c	0 b	0 b
80	7,9 b	7,9 b	12,6 a	5,17 b	5,17 ab	5,6 a
120	14,7 a	18,1 a	18,0 a	20,3 a	12,8 a	9,8 a

Médias seguidas de letra não diferem entre si nas linhas pelo teste de Tukey (p<0,05).

Fig. 5 Microscopia eletrônica de varredura em ápices caulinares de *E. grandis* X *E. urophylla*. (a) ápice excisado (b) ápice excisado após uma semana de recuperação (c) ápice exposto ao PVS2 por 60 minutos (d) ápice exposto ao PVS2 por 60 minutos e imerso em nitrogênio líquido, após uma semana de recuperação (e) ápice exposto ao PVS2 por 80 minutos e imersos em nitrogênio líquido (f) ápice exposto ao PVS2 por 80 minutos e imersos em nitrogênio líquido, após uma semana de recuperação (g) ápice exposto ao PVS2 por 120 minutos e imersos em nitrogênio líquido (h) ápice exposto ao PVS2 por 120 minutos e imersos em nitrogênio líquido, após uma semana de regeneração

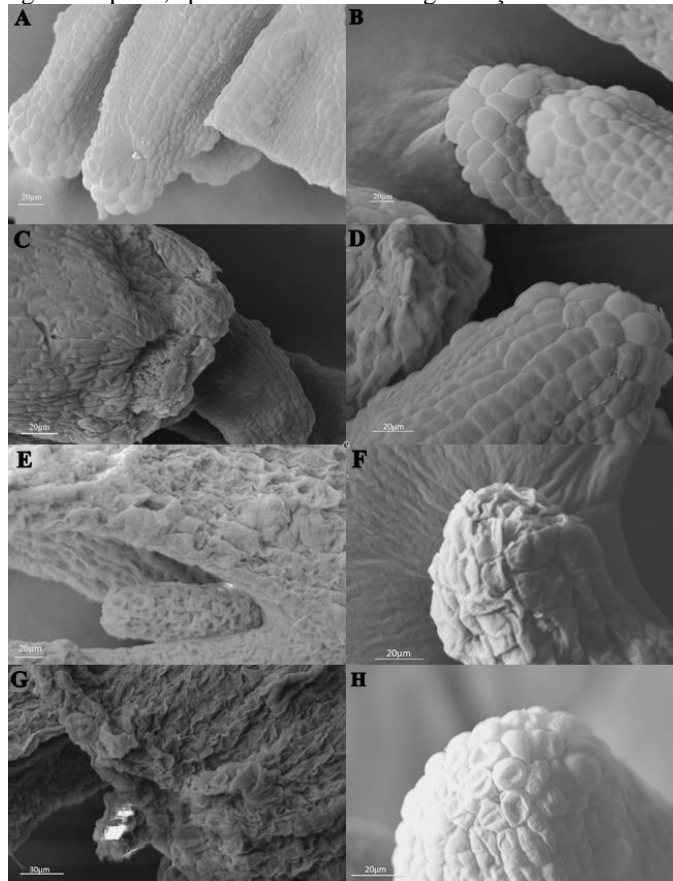
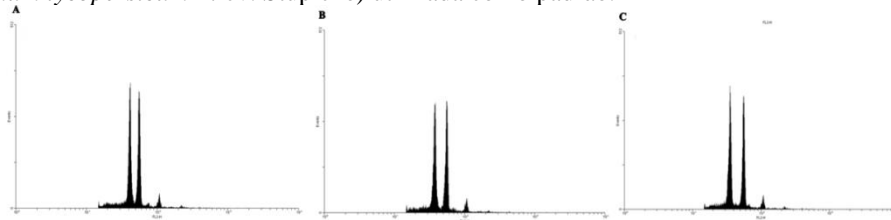


Tabela 3. Conteúdo de DNA e Coeficiente Variação das plantas controle total, controle de PVS2 (NL-) e criopreservadas (NL+) de *E.grandis* X *E.urophylla* por citometria de Fluxo

Tratamentos	Conteúdo de DNA (pg)	CV (%)
Controle total	1,36 a	0,71 a
Controle PVS2 (LN-)	1,37 a	0,83 b
Planta Criopreservada (LN+)	1,33 a	0,94 b

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Scott Knott.

Fig. 6 Histograma de DNA de preparações nucleares de plantas *in vitro* de *E.grandis* X *E.urophylla*. Primeiro pico: (a) folhas de plantas controle total; (b) folhas de plantas submetidas ao tratamento com PVS2 por 60 minutos (NL-); (c) folhas de plantas submetidas ao tratamento com PVS2 por 60 minutos e posterior imersos em nitrogênio líquido (NL+). Segundo pico: representa a fase G1 de tomate (*Solanum lycopersicum* L. cv. Stupické) utilizada como padrão.



## REFERÊNCIAS

Alves, E. Curso: introdução à microscopia eletrônica de varredura e de transmissão. FAEPE: Universidade Federal de Lavras, 2004, 43 p. Apostila.

Barraco G, Sylvestre I, Collin M, Escoute J, Lartaud M, Verdeil J L, & Engelmann F (2014). Histocytological analysis of yam (*Dioscorea alata*) shoot tips cryopreserved by encapsulation-dehydration. *Protoplasma* 251: 177-189. <https://doi.org/10.1007/s00709-013-0536-5>  
Benson E E, Bremner, D. (2004). Oxidative stress in the frozen plant: a free radical point of view. *Life in the frozen state*, 206-241.

Burritt D J (2008) Efficient cryopreservation of adventitious shoots of *Begonia x erythrophylla* using encapsulation–dehydration requires pretreatment with both ABA and proline. *Plant cell, tissue and organ culture*, 95: 209. <https://doi.org/10.1007/s11240-008-9434-5>

Chen, x.-l. et al. (2011). Cryopreservation of in vitro-grown apical meristems of *Lilium* by droplet-vitrification. *South African Journal of Botany*, 77, 2, 397-403.

Chua S P, & Normah M N (2011) Effect of preculture, PVS2 and vitamin C on survival of recalcitrant *Nephelium ramboutan-ake* shoot tips after cryopreservation by vitrification. *CryoLetters*, 32: 506-515. <https://doi.org/>

Crowe JH, Carpenter JF, Crowe LM, Anchoroguy TJ(1990) Are freezing and dehydration similar stress vectors? A comparison of modes of interaction of stabilizing solutes with biomolecules. *Cryobiology* 27:219–231. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(90\)90023-W](https://doi.org/10.1016/0011-2240(90)90023-W)

Condello E, Caboni E, Andrè E, Piette B, Druart P, Swennen R, & Panis B (2011) Cryopreservation of apple *in vitro* axillary buds using droplet-vitrification. *CryoLetters*, 32:175-185.<https://doi.org/>

Eldridge S R, Thornburn P J, McEwan K L, & Hatton T J (1993) Health and structure of Eucalyptus communities on Chowilland and Monoman Islands of the River Murray floodplain, South Australia.  
Engelmann F (2004) Plant cryopreservation: progress and prospects. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 40: 427-433. <https://doi.org/10.1079/IVP2004541>

Engelmann F (2011) Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 47: 5-16.<https://doi.org/10.1007/s11627-010-9327-2>

Esteves, R. A.; Martins, J. H.; Ferreira, W. R. Viabilidade do reflorestamento com eucalipto para produção de carvão. *Brazilian Journal of Development*. 6 (1), 796-805, 2020.

Ferreira DF (2011) SISVAR: a computer statistical analysis system. *Ciênc agrotec* 35(6):1039–1042. doi:10.1590/S1413-70542011000600001

Galdiano R F, Lemos E G, Faria R T, Vendrame W A (2012) Cryopreservation of *Dendrobium* hybrid seeds and protocorms as affected by phloroglucinol and Supercool X1000. *Scientia Horticulturae* 148:154-160.

Grattapaglia D (2004) Integrating genomics into Eucalyptus breeding. *Genet Mol Res* 3: 369-379. <https://doi.org/>

Grapin, A.; Gallard, A.; Chevalier, M. (2011). Cryopreservation of *Pelargonium* species: a comparative study of encapsulation-dehydration and droplet-vitrification protocols. In: XXVIII International Horticultural Congress on Science and Horticulture for People (IHC2010): III International Symposium on 918. p. 131-137.

Harding K (2004) Genetic integrity of cryopreserved plant cells: a review. *CryoLetters* 25: 3-22. <https://doi.org/>

Hazubska-Przybył T, Chmielarz P, Michalak M, Bojarczuk K. (2010). Cryopreservation of embryogenic tissues of *Picea omorika* (Serbian spruce). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 102: 35-44. [https://doi.org](https://doi.org/)

Heringer A S, Steinmacher D A, Schmidt É C, Bouzon Z L, Guerra, M P (2013) Survival and ultrastructural features of peach palm (*Bactris gasipaes*, Kunth) somatic embryos submitted to cryopreservation through vitrification. *Protoplasma*, 250: 1185-1193. <https://doi.org/>

Hirano T, Godo T, Mii M, Ishikawa K (2005) Cryopreservation of immature seeds of *Bletilla striata* by vitrification. *Plant Cell Reports* 23: 534-539. <https://doi.org/10.1007/s00299-004-0893-9>

Kaya E, Rodrugues, L, Jenderek M, Hernandez-ellis M, Ozudogru A, Ellis D (2013) Cryopreservation of Eucalyptus Genetic Resources. *CryoLetters* 34: 608-618. <https://doi.org/>

Keller E R, Kaczmarczyk A, Senula A (2008) Cryopreservation for plant genebanks—a matter between high expectations and cautious reservation. *CryoLetters* 29:53-62. <https://doi.org/2008/00000029/00000001>

Martín C, González-Benito M E (2005) Survival and genetic stability of *Dendranthema grandiflora* Tzvelev shoot apices after cryopreservation by vitrification and encapsulation-dehydration. *Cryobiology* 51:281-289. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2005.08.001>

Marie d brown, s (1993). A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C values for 70 species. *Biol Cell* 78: p.41-51.

Matsumoto, t.; sakai, a. (2003). Cryopreservation of axillary shoot tips of in vitro-grown grape (*Vitis*) by a two-step vitrification protocol. *Euphytica*, 131, 3, 299-304.

Murashige T, Skoog, F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum* 15: 473-497.

Le TN, McQueen-Mason SJ (2006) Desiccation-tolerant plants in dry environments. *Rev Environ Sci Biotechnol* 5:269–279

Padayachee K, Watt M P, Edwards N, Mycock D J (2009) Cryopreservation as a tool for the conservation of Eucalyptus genetic variability: concepts and challenges. *Southern Forests: a Journal of Forest Science* 71: 165-170.

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

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

Rahmah, S. et al. (2015) Effects of Droplet-Vitrification Cryopreservation Based on Physiological and Antioxidant Enzyme Activities of *Brassidium* Shooting Star Orchid. *The Scientific World Journal*, 2015.

Reed, B. M. (2008). *Plant Cryopreservation: A Practical Guide*. OR, USA: Springer.

Shatnawi, M. A. et al. (2011). Clonal propagation and cryogenic storage of the medicinal plant *Stevia rebaudiana*. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 9, 1, 213-220.

Sakai A, Engelmann, F (2007) Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: a review. *CryoLetters*, 28:151-172.

Sakai, a.; hirai, d.; niino, t. (2008) Development of PVS-Based vitrification and encapsulation: vitrification protocols. In: REED, B. M. (Ed.). *Plant cryopreservation: a practical guide*. Corvallis: Springer, p. 33-58.

Salehnia M, Moghadam EA, Velojerdi MR (2002) Ultrastructure of follicles after vitrification of mouse ovarian tissue. *Fertility and sterility* 78: 644-645.

Souza FV D, Kaya E, de Jesus Vieira L, de Souza, E H, de Oliveira Amorim, V B, Skogerboe, D, Jenderek M M (2016) Droplet-vitrification and morphohistological studies of cryopreserved shoot tips of cultivated and wild pineapple genotypes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 124: 351-360.

Toshikazu M, Akira S (2003) Cryopreservation of axillary shoot tips of in vitro-grown grape (*Vitis*) by a two-step vitrification protocol. *Euphytica* 131:299–304.

Ulrich, i.; ulrich, w. (1991) High-resolution flow cytometry of nuclear DNA in higher plants. *Protoplasma*, New York, 165, 1/3, 212-215.

Wang, B., Li, J. W., Zhang, Z. B., Wang, R. R., Ma, Y. L., Blystad, D. R., ... & Wang, Q. C. (2014ab). Three vitrification-based cryopreservation procedures cause different cryo-injuries to potato shoot tips while all maintain genetic integrity in regenerants. *Journal of biotechnology*, 184, 47-55.

Wang, R. R., Gao, X. X., Chen, L., Huo, L. Q., Li, M. F., & Wang, Q. C. (2014). Shoot recovery and genetic integrity of *Chrysanthemum morifolium* shoot tips following cryopreservation by droplet-vitrification. *Scientia Horticulturae*, 176, 330-339

Watt, M. P., Blakeway, F. C., Mokotedi, M. E. O., & Jain, S. M. (2003). Micropropagation of *Eucalyptus*. In *Micropropagation of woody trees and fruits* (pp. 217-244). Springer Netherlands.

Watt, M. P., Thokoane, N. L., Mycock, D., & Blakeway, F. (2000). In vitro storage of *Eucalyptus grandis* germplasm under minimal growth conditions. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 61(2), 161-164.

Wen, B., Cai, C., Wang, R., Song, S., & Song, J. (2012). Cytological and physiological changes in recalcitrant Chinese fan palm (*Livistona chinensis*) embryos during cryopreservation. *Protoplasma*, 249(2), 323-335.

Yil, J. Y., Sylvestre, I., Colin, M., Salma, M., Lee, S. Y., Kim, H. H., ... & Engelmann, F. (2012). Improved cryopreservation using droplet-vitrification and histological changes associated with cryopreservation of Madder (*Rubia akane* Nakai). *Korean Journal of Horticultural Science and Technology*, 30(1), 79-84.

Volk, G.M; Caspersen, A.M. (2007). Plasmolysis and recovery of different cell types in cryoprotected shoot tips of *Mentha x piperita*. *Protoplasma*, 231(3), 215-226.

Volk, G.M.; Walters, Christina (2006). Plant vitrification solution 2 lowers water content and alters freezing behavior in shoot tips during cryoprotection. *Cryobiology*, 52, 48-61, 2006.

Zhang, J. M., Han, L., Lu, X. X., Volk, G. M., Xin, X., Yin, G. K., ... & Chen, X. L. (2017). Cryopreservation of Jerusalem artichoke cultivars using an improved droplet-vitrification method. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 128(3), 577-587.