

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Centro de Desenvolvimento Tecnológico

Curso de Graduação em Biotecnologia



Trabalho de Conclusão de Curso

**Criopreservação de ápices de batata (*Solanum tuberosum* L.) cultivar BRS
Clara através da técnica de encapsulamento-vitrificação**

Daniele de Souza Masiero

Pelotas, 2014

DANIELE DE SOUZA MASIERO

Criopreservação de ápices de batata (*Solanum tuberosum L.*) cultivar BRS Clara através da técnica de encapsulamento-vitrificação

Trabalho acadêmico apresentado ao Curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora Acadêmica: Prof. Dra. Luciana Bicca Dode

Orientador de Estágio: Dr. Leonardo Ferreira Dutra

Pelotas, 2014

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

M394c Masiero, Daniele de Souza

Criopreservação de ápices de batata (*solanum tuberosum* L.) cultivar brs clara através da técnica de encapsulamento-vitrificação / Daniele de Souza Masiero ; Luciana Bicca Dode, Leonardo Ferreira Dutra, orientadores. — Pelotas, 2014.

40 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) — Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, 2014.

1. Temperaturas ultra baixas. 2. Viabilidade. 3. Congelamento. 4. Pvs2. I. Dode, Luciana Bicca, orient. II. Dutra, Leonardo Ferreira, orient. III. Título.

CDD : 635.21

Daniele de Souza Masiero

Criopreservação de ápices de batata (*Solanum tuberosum L.*) cultivar BRS
Clara através da técnica de encapsulamento-vitrificação

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado, como requisito parcial, para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 26/11/2014

Banca Examinadora:

Dra. Luciana Bicca Dode (Orientadora), Universidade Federal de Pelotas

Dra. Daiane Peixoto Vargas, Embrapa Clima Temperado

Dr. Luciano da Silva Pinto, Universidade Federal de Pelotas

“Dedico este trabalho de conclusão de curso à minha família, meus amigos e meus professores e orientadores sem eles não seria possível essa conquista”.

Agradecimentos

A Deus pelas conquistas alcançadas e a força dada nos momentos mais difíceis.

A meu pai Valmor e minha mãe Enir pela dedicação extrema em garantir minha educação, pelos exemplos, pelo amor, carinho, preocupação e apoio incondicional, assim como meus avós e tios por sempre me incentivarem e acreditarem na minha capacidade.

A minha irmã Franciele por toda amizade, companheirismo e apoio ao longo dos anos e por ser minha fonte de inspiração.

A Universidade Federal de Pelotas pela oportunidade e a todos os professores do curso de Graduação em Biotecnologia, por todos os ensinamentos.

À orientadora acadêmica Prof^a. Dra. Luciana Bicca Dode, pela confiança depositada em mim para a realização dos trabalhos, pela oportunidade de aprender e crescer durante o tempo de estágio e pelo incentivo a não desistir do curso.

Ao orientador de estágio Dr. Leonardo Ferreira Dutra, pela oportunidade, incentivo e confiança em mim depositada e a Dra. Daiane Peixoto Vargas, pela amizade, orientação, incentivo e auxílio durante toda realização do trabalho.

A todo pessoal do Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Clima Temperado, e do Laboratório de Biotecnologia Vegetal do CDTec, que além de colegas de trabalho maravilhosos, se mostraram amigos para todas as horas, especialmente ao Antônio Nino, Ju, Carol e Liana.

Aos meus colegas, companheiros e amigos conquistados durante a graduação, pelo companheirismo, apoio e por tudo que passamos juntos, em especial a Juliana, Catrine, Arthur B., Gregori, Rodrigo por toda companhia nas horas alegres e complicadas, por todas conversas, jantas, festas e risadas e principalmente pela amizade sem medida, que pretendo preservar ao longo do tempo.

A Natasha por toda sintonia durante esses anos de faculdade, pela paciência interminável, motivação, pela infinita ajuda em todas disciplinas, sinceridade e parceria sem tamanho em todos os momentos da graduação, que isso perdure por anos, que ainda tenhamos muitas festas para ir e muita história para contar.

E aos amigos de Vacaria, que se fizeram presentes mesmo em meio a tanta distância, em especial ao Douglas pelas conversas intermináveis durante todos os dias, e também a Catarini por todos esses anos de amizade e cumplicidade, por abraçar meus sonhos e planos, não me deixar desistir nunca e acreditar em mim quando nem eu mesma o fazia, que nossa amizade perdure ao longo da vida e que ainda possamos comemorar muitas conquistas em conjunto.

Obrigada por tudo!

Resumo

MASIERO, Daniele S. **Criopreservação de ápices de batata (*Solanum tuberosum* L.) cultivar BRS Clara através da técnica de encapsulamento-vitrificação.** 2014. 40f. Trabalho de Conclusão de Curso — Curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas.

Para conservação das culturas in vitro por longo prazo a técnica preferivelmente utilizada é a criopreservação. Uma das metodologias referentes é a de encapsulamento seguido de vitrificação, envolvendo ajustes à utilização da solução de vitrificação de plantas, com formulações específicas responsáveis pelo sucesso e pela sobrevivência dos explantes após ao congelamento. O objetivo deste trabalho foi avaliar o percentual de viabilidade de ápices de *Solanum tuberosum* L. cv. BRS Clara, após a aplicação da técnica de encapsulamento-vitrificação com a utilização de diferentes períodos de exposição à solução de vitrificação (PVS2). Para avaliar o efeito da exposição ao PVS2 ápices de batata da cultivar BRS Clara foram excisados e pré-cultivados em meio de cultura, MS durante 26 dias em incubadora B.O.D., com fotoperíodo de 16 horas a $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Após esse período os explantes foram submetidos a um protocolo de encapsulamento, em que ocorreu a formação do endosperma artificial, colocados em contato com a solução de vitrificação por diferentes períodos e expostos ao nitrogênio líquido. Após descongelamento, as cápsulas não expostas ao PVS2 (controle) foram as que apresentaram a menor taxa de viabilidade (48%), enquanto que as plantas imersas em PVS2 e imediatamente expostas ao nitrogênio líquido apresentaram sobrevivência de 100%. O estudo demonstrou ser simples e eficaz para a criopreservação de germoplasma de batata cv. BRS Clara, no entanto, é necessário examinar a aplicabilidade e possível aperfeiçoamento do mesmo para utilização em outros genótipos de batata, assim como adaptação para outras espécies.

Palavras Chave: temperaturas ultra baixas; viabilidade; congelamento; PVS2

Abstract

MASIERO, Daniele S. **Criopreservação de potato shoots (*Solanum tuberosum* L.) cultivar BRS Clara through the encapsulation-vitrification technique.** 2014. 40f. Trabalho de Conclusão de Curso — Curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas.

Aiming the long-term conservation of crops in vitro the preferred technique used is the cryopreservation. One of the related methods is the encapsulation followed by vitrification, what involves adjustments for the use of solutions of vitrification in plants, with specific formulations responsible for the survival of explants post freeze. The purpose of this study was to evaluate the percentage of viability of shoots of *Solanum tuberosum* L. cv. BRS Clara, after the application of the encapsulation-vitrification technique using different exposure periods in the solution of vitrification (PVS2). To evaluate the effects of the exposure to the PVS2, shoots were excised and precultured in culture medium, MS for 26 days in a B.O.D hatchery, with a photoperiod of 16 horas a $4 \pm 2^\circ\text{C}$. Afterwards the explants were subjected to a encapsulation protocol, on which the formation of artificial endosperm, placed in contact with the vitrification solution for different periods and exposed to liquid nitrogen. After thawing, the unexposed capsules PVS2 (control) were those with the lowest viability rate (48%), while the plants immersed in PSV2 and immediately exposed to liquid nitrogen reached 100% survival. The method shown to be simple and efficient for the criopreservação of potato germplasm cv. BRS Clara. However, it is necessary to examine the applicability and possible improvement for the use in other potato genotypes, as well as adaptation to other species.

Palavras Chave: Ultra low temperatures; viability; freezing; PVS2

Lista de Figuras

Figura 1	Cultivar BRS Clara.....	16
Figura 2	Esquema de encapsulamento	24
Figura 3	Vitrificação.....	25
Figura 4	Cápsulas pós vitrificação.....	27
Figura 5	Cápsulas não submetidas a vitrificação	28
Figura 6	Ápices encapsulados após vitrificação.....	28
Figura 7	Média de viabilidade dos explantes.....	30

Lista de Tabelas

Tabela 1	Porcentagem de sobrevivência em ápices de batata cultivar BRS Clara, obtido através da técnica de encapsulamento-vitrificação, submetidos a diferentes tempos de imersão em solução de vitrificação de plantas.	26
----------	--	----

Lista de Abreviaturas e Siglas

CIP – International Potato Center

cv – Cultivar

DMSO – Dimetilsulfóxido

Embrapa – Empresa brasileira de pesquisa agropecuária

EPAGRI – Empresa de pesquisa agropecuária e extensão rural de Santa Catarina

M – Mol

mL– Mililitro

mm – Milímetro

MS – Murashige & Skoog

pH – Potencial Hidrogeniônico

PVS2 – Plant Vitrification Solution 2

SUMÁRIO

1 Introdução	14
2 Objetivos	15
2.1 Objetivo geral.....	15
2.2 Objetivos específicos.....	16
3 Revisão de Literatura	16
3.1 Cultura da batata (<i>Solanum tuberosum L.</i>).....	16
3.1.2 Cultivar BRS Clara.....	16
3.2 Cultura in vitro Vegetal.....	17
3.3 Conservação de germoplasma.....	18
3.4 Criopreservação.....	19
3.4.1 Vitriificação.....	20
3.5 Encapsulamento – Vitriificação.....	22
4 Metodologia	24
4.1 Obtenção dos ápices de batata cv. BRS Clara.....	24
4.2 Encapsulamentos dos explantes.....	24
4.3 Vitriificação.....	25
5 Resultados e Discussão	27
6 Conclusões e Perspectivas	32
Referências	33

1 Introdução

A batata (*Solanum tuberosum L.*) é uma dicotiledônea da família Solanaceae, originária dos Andes que teve produção disseminada na Europa no século XVI (HAWKES, 1978). Atualmente ocupa o quarto lugar em importância mundial, como fonte de alimento para o homem sendo conhecida também por sua vasta diversidade e número de cultivares relatada (LUSA, 2009). Diante disso, torna-se necessário o armazenamento desse material genético garantindo a variabilidade da espécie para oferecer suporte aos programas de melhoramento genético.

O cultivo da batata a campo é realizado via tubérculos, o que representa risco de perda do material, devido a fatores bióticos e abióticos como doenças, pragas, condições climáticas desfavoráveis e outros acidentes (SILVA e PEREIRA, 2011). A conservação *ex situ*, realizada em condições de laboratório utilizando técnicas de cultivo *in vitro* é de extrema relevância proporcionando a obtenção e manutenção de plantas com qualidade fitossanitária elevada, conservação da identidade genética, diminuição de mão de obra, custo e espaço (FORTES e PEREIRA, 2003).

Dentre as técnicas utilizadas está a metodologia de criopreservação de plantas através de encapsulamento seguido de vitrificação, em que uma matriz de alginato envolve o explante e o protege de possíveis danos causados pela exposição as ultra-baixas temperaturas do nitrogênio líquido (SAKAI e ENGELMANN, 2007). Esta acaba sendo uma alternativa viável para o armazenamento de propágulos da cultura em longo prazo, já que apresenta vantagem de reduzir o risco de variação somaclonal durante a estocagem.

O presente trabalho de conclusão do Curso de Bacharelado em Biotecnologia, procura estabelecer um protocolo para conservação de germoplasma *in vitro* de batata cultivar BRS Clara, com aplicação do método de encapsulamento de ápices seguido de vitrificação, avaliando a exposição à solução de vitrificação (PVS2), quanto a porcentagem de viabilidade dos explantes pós-contato com nitrogênio líquido.

Inicialmente, é apresentada uma revisão de literatura abordando características da espécie e das técnicas de encapsulamento e vitrificação. Após apresentação desta revisão é detalhado o experimento realizado, bem como, a metodologia aplicada e resultados obtidos.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar o percentual de viabilidade de ápices de *Solanum tuberosum* L. cv. BRS Clara, após a aplicação da técnica de encapsulamento-vitrificação com a utilização de diferentes tempos de exposição à solução de vitrificação.

2.2 Objetivos Específicos

- Estabelecer um protocolo de encapsulamento-vitrificação para ápices de BRS Clara;
- Estabelecer o melhor tempo de exposição à solução de vitrificação de plantas 2 (PVS2), para a cultivar em questão.

3 Revisão de Literatura

3.1 Cultura da batata (*Solanum tuberosum* L.)

A batata é uma espécie dicotiledônea pertencente à família Solanaceae. O cultivo original da batata iniciou com espécies selvagens do gênero *Solanum* nos Andes da América do Sul e no Chile (HAWKES, 1978), posteriormente trazidas para a Europa e distribuídas para o mundo todo, principalmente para as regiões de clima Temperado (HAWKES, 1990). Apenas cerca de 20 espécies são cultivadas, sendo que a mais popular é a *Solanum tuberosum* (SILVA e PEREIRA, 2011).

No Brasil, a cultura ocupa uma área em torno de 127.266 hectares e a produção de aproximadamente 3.496.166 toneladas, com maior destaque na região sudeste e sul do país (IBGE, 2013), onde o Rio Grande do Sul ocupa o quarto lugar em produção, perdendo apenas para Minas Gerais, São Paulo e Paraná (PEREIRA et al., 2010). De acordo com o “*The International Potato Center*” (2011), espera-se que o aumento na produção mundial de batata seja de 40% até 2020.

A batata é propagada vegetativamente por meio de tubérculos, embora algumas produzam sementes, a propagação clonal possibilita que o vigor híbrido obtido a partir de cruzamentos seja mantida nas gerações (SILVA e PEREIRA, 2011), além disso, atualmente a micropropagação in vitro de batata é altamente viável e utilizada rotineiramente para a produção de plantas com alta qualidade fitossanitária (DUTRA et al., 2010).

3.1.2 Cultivar BRS Clara

A cultivar utilizada nesse estudo (Figura. 1) foi lançada em 2010 pelo Programa de Melhoramento Genético da Empresa brasileira de pesquisa em agropecuária (Embrapa), formado pela Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, Embrapa Produtos e Mercado, Canoinhas-SC, e Embrapa Hortaliças, Brasília-DF.

Codificada como clone 12-2, é derivada de um cruzamento de 'White Lady' (mãe) e 'Catucha' (pai). White Lady é uma cultivar húngara enquanto que a cultivar Catucha foi selecionada pela EPAGRI (PEREIRA et al., 2013).



Figura 1. Cultivar BRS Clara.
Foto: Arione Pereira, Embrapa Clima Temperado, 2013

Possuí um ciclo de desenvolvimento médio; tubérculos de formato longo, película amarela, polpa creme e teor mediano de massa seca (PEREIRA et al., 2010), a cultivar faz parte da coleção de germoplasma existente na unidade Clima Temperado da Embrapa do município de Pelotas.

3.2 Cultura in vitro

A cultura in vitro de tecidos vegetais é uma alternativa usada para a produção de mudas em larga escala (ASSIS, 1999), o que tem possibilitado a obtenção e multiplicação de clones livres de doenças virais (FORTES e PEREIRA, 2003).

De acordo com Bajaj e Sopory (1988), os trabalhos com cultura de tecidos em batata foram iniciados na década de 1950 e atualmente a micropropagação in vitro da espécie é utilizada rotineiramente para a produção de plantas com alta qualidade fitossanitária e fidelidade genética (DUTRA et al., 2010).

O cultivo in vitro de batata para micropropagação encontra-se bem estabelecido, com possibilidade de uso de meristemas, ápices caulinares, segmentos nodais e gemas laterais (FORTES e PEREIRA, 2003), o que serve de apoio para construção de centros de conservação de germoplasma.

3.3 Conservação de germoplasma

A espécie (*Solanum tuberosum* L.) é conhecida por sua vasta diversidade genética e a grande quantidade de cultivares relatada (Food and Agriculture Organization, 2007). Diante do grande interesse levantado pela manutenção da biodiversidade e a prevenção da extinção desse material as espécies cultivadas são objeto de ações de conservação (VERÍSSIMO et al., 2001).

As formas de conservação existentes podem ser denominadas: in situ o recurso genético é mantido em sua condição natural como reservas e parques florestais (SCARIOT e SEVILLA, 2007), ou ex situ, em bancos de germoplasma, centros de recursos genéticos e coleções privadas (KRYSZCZUK et al., 2011).

O Centro Internacional da Batata (CIP), localizado no Peru é o maior banco de germoplasma da espécie e conta com uma vasta gama de formas, tamanhos, cores e sabores (LUSA, 2009). Segundo Roca (1975) desde a década de 70 o CIP tem contribuído com técnicas de cultura de tecidos para conservação do germoplasma da batata, a partir daí organizações internacionais têm tomado iniciativas de coletar, avaliar e preservar genótipos selvagens e primitivos mantendo um *pool* gênico para que esse material possa ser utilizado no futuro (WILKINS, 1983).

Para preservação de um germoplasma é necessário manter uma forma clonal por meios apropriados de propagação vegetativa (LIZARRAGA, 1988), embora a batata produza sementes essas são altamente heterozigotas, necessitando a criação de uma coleção clonal para a conservação de genótipos individuais (MOREL, 1975). O cultivo da batata, assim como de outras variedades vegetais, normalmente possui coleções a campo e/ou in vitro (KRYSZCZUK et al., 2006).

Durante a década de 70 a coleção do CIP foi mantida apenas a campo, anualmente era plantada, os tubérculos colhidos e armazenados até a temporada seguinte (MOREL, 1975), porém o risco de perda do material era considerado grande devido a fatores bióticos e abióticos como doenças, pragas, condições climáticas desfavoráveis ou outros acidentes (WITHERS, 1985).

Devido a isso os estudos foram concentrados na manutenção desse germoplasma *in vitro* (DODDS, 1986). O CIP conta com cerca de 2000 genótipos selvagens e 4000 acessos de batata cultivadas (BAI, et al., 2011), no Brasil, a Embrapa Clima Temperado, em conjunto com a Embrapa Hortaliças e a Embrapa Transferência de Tecnologia, possuem um Banco ativo de germoplasma da cultura onde constantemente são acrescentados novos acessos.

Esses bancos normalmente utilizam as técnicas de cultura de tecidos para retardar o crescimento, normalmente envolvendo meios que desaceleram o metabolismo e condições controladas de temperatura, que fazem com que a planta se desenvolva mais lentamente (BARANDALLA et al., 2003), porém em armazenamento a longo prazo, há riscos de falha na câmara de cultivo ocasionando perda de material, assim como o possível aparecimento de variações somaclonais, instabilidade genética além dos altos custos de manutenção (HARDING, 1991). Por outro lado, através da técnica de criopreservação, há uma pausa completa do crescimento, pois as plantas são conservadas em temperaturas ultra-baixas, o que a torna uma alternativa para os problemas enfrentados no método de crescimento lento (SCHERWINSKI e PEREIRA, 2010).

3.4 Criopreservação

Para conservação das culturas *in vitro* por longo tempo a técnica preferivelmente utilizada é a criopreservação. A criopreservação de batata teve início em 1977 com procedimentos de refrigeração e congelamento ultra rápido (BAJAJ, 1977).

A técnica consiste no armazenamento de material biológico em temperaturas ultra baixas (-196°C), em um meio criogênico, assim como nitrogênio líquido (ENGELMANN, 2000). Nessa temperatura toda divisão celular e processos metabólicos param ou são minimizados, permitindo que o material vegetal seja estocado sem alterações por um período teoricamente ilimitado de tempo (ARNAO e ENGELMANN, 2006). Nesse contexto a criopreservação de ápices oferece capacidade de armazenamento a longo prazo garantindo a máxima estabilidade de características fenotípicas e genotípicas (ENGELMANN, 1997), embora os ápices sejam estruturas complexas, que existem tratamentos de proteção criogênica para

garantir sua integridade estrutural, induzindo tolerância ao frio e permitindo sua criopreservação (ENGELMANN, 2000).

Embora a utilização de substâncias crioprotetoras seja muito importante para o sucesso da técnica, o fator chave para criopreservação não é a tolerância ao congelamento e sim a desidratação e sua indução (REED, 2005), já que o estado da água e o equilíbrio osmótico relacionado com os movimentos de líquidos dentro e fora da célula são parâmetros de grande importância, visto que a retirada da água exerce um papel central na prevenção de lesões por congelamento e na manutenção da viabilidade pós-descongelamento (MAZUR, 2004).

A técnica possui grande aplicabilidade e atualmente além de manter cultivo de batata *in vitro* o CIP conserva genótipos congelados em nitrogênio líquido, através da técnica de vitrificação (KACZMARCZYK, 2011).

3.4.1 Vitrificação

Refere-se ao processo físico no qual envolve a aplicação de soluções crioprotetoras que aumentam a viscosidade da célula a um ponto crítico com a finalidade de não formar cristais nos tecidos após o congelamento, é definido como a transição da fase líquida para um sólido vítreo amorfo (FAHY et al., 1984).

Esse estado vítreo pode contribuir para evitar o colapso do tecido, concentração de soluto e alterações de pH durante a desidratação, devido à sua elevada viscosidade as reações químicas que requerem a difusão molecular da água são praticamente detidas, levando a uma condição de estabilidade do material biológico possibilitando sua manutenção durante um longo período de tempo (BURKE, 1986).

Para atingir um estado de vitrificação, existem dois requisitos necessários: (i) congelamento rápido e (ii) uma solução celular concentrada, que normalmente é obtida por meio de secagem ao ar, aclimatação no frio e aplicação de substâncias

penetrantes ou não penetrantes, que causam desidratação para evitar a injúria após o resfriamento rápido em nitrogênio líquido (REED, 2005).

Procedimentos baseados em vitrificação têm ganhado importância e apresentam maior potencial de ampla aplicabilidade (ENGELMANN et al., 2008). Em um protocolo baseado em vitrificação sob condições bem otimizadas, a totalidade ou a maior parte da estrutura meristemática permanece intacta, o que garante regeneração direta, sem a formação de calo (HIRAI e SAKAI, 1999), que segundo Takagi (2000) é essencial para a conservação clonal de germoplasma, pois evita a instabilidade genética que pode ser produzida na rebrota após a criopreservação.

Um passo limitante da vitrificação é o controle do processo de desidratação e a prevenção da toxicidade ou estresse osmótico causado pela solução de vitrificação (SAKAI e ENGELMANN, 2007). A solução mais utilizada e eficiente é a “*Plant Vitrification Solution 2*”, que é composta por 30% de glicerol + 15% de etileno glicol + 15% de dimetilsulfóxido (DMSO) em meio de cultura contendo 0,4 M de sacarose (SAKAI et al., 1990).

A solução de PVS2 auxilia na criopreservação dos explantes, substituindo a água celular e mudando o comportamento das células, os componentes da solução são responsáveis por diminuir o dano do encolhimento celular excessivo e limitar o risco de formação de gelo (VOLK e WALTERS, 2005).

Para atenuar a tensão mecânica provocada pelo tratamento com essa solução, um pré-tratamento com crioprotetores em uma concentração inferior pode aumentar significativamente a tolerância à desidratação. Normalmente um meio líquido contendo uma combinação de sacarose e glicerol aplicado durante 30 minutos à temperatura ambiente é muito eficaz para aumentar a osmotolerância (SAKAI, 2004).

Estudos atuais discutem sobre o tempo de exposição ao PVS2, já que tempos longos podem ser tóxicos a planta e tempos reduzidos podem não ser suficientes para proteção do explante (KACZMARCZYK et al., 2011). Estipular tempos adequados de exposição ao PVS2 é um passo padrão para a identificação de métodos bem sucedidos de vitrificação para qualquer espécie ou cultivar (Kim et al., 2009), já que essa desidratação acaba permitindo maior sobrevivência de explantes,

que são submetidos ao nitrogênio líquido, por diminuir as chances da formação de cristais de gelo (VERTUCCI, 1991).

3.5 Encapsulamento - Vitrificação

É uma técnica que combina os procedimentos de encapsulamento e de vitrificação, as amostras são encapsuladas em pérolas de alginato, e em seguida, submetidas a congelamento seguindo a abordagem da técnica de vitrificação. (SAKAI e ENGELMANN, 2007).

O encapsulamento de propágulos foi proposto por Murashige (1977), sendo considerado uma modalidade de cultura de tecidos de plantas, que consiste em encapsular embriões somáticos, ápices caulinares ou gemas axilares (CID, 2004). É um método rápido de multiplicação, que mantém a fidelidade genética das plantas e permite passagem direta a campo sem gastos com casas de vegetação (FUJI et al., 1987), além disso a utilidade de encapsulamento de explantes *in vitro* também foi demonstrada em outros campos de aplicação, tais como a criopreservação de recursos genéticos de plantas (GARDI et al., 1999).

O desenvolvimento da tecnologia de encapsulamento já foi adaptado para embriões somáticos, ápices, agregados celulares, ou qualquer outro tecido que possa ser utilizado para promover uma planta inteira e que retém este potencial após armazenamento (CAPUANO et al., 1998). O encapsulamento une um material de revestimento e um endosperma artificial para a nutrição do explante, o revestimento pode utilizar diversos materiais, tais como ágar, agarose, carboximetilcelulose, carrageninas, gelrite, nitrocelulose, poliacrilamida, polyox, contudo o alginato 5% tem sido o agente gelificante mais utilizado desde 1988 (LAMBARDI *et al.* 2006).

O hidrogel de alginato possui características adequadas para a função de revestimento, tais como viscosidade moderada, baixa toxicidade e rápida gelificação (REDENBAUGH *et al.* 1993), e a possibilidade de ser homogeneizado com meio nutritivo para a produção do endosperma artificial, o que é de extrema importância já que além de prover proteção mecânica para o explante, o encapsulamento também

deve ser capaz de prover os nutrientes necessários para que o mesmo possa se desenvolver em uma nova planta (LAMBARDI *et al.* 2006).

Os materiais e métodos do encapsulamento variam de espécie para espécie e entre cultivares (NYENDE *et al.*, 2003). Basicamente as cápsulas são feitas associando os tecidos a solução de alginato e posteriormente gotejando-os em solução de cálcio (FUJI *et al.*, 1987). O sucesso da técnica de encapsulamento com o gel de alginato é devido, principalmente, ao ambiente delicado de proteção que ele fornece para o material retido (SMIDSROD e SKJAK-BREAK, 1990), guardando o explante de danos físicos e permitindo que a germinação ocorra sem induzir variações indesejáveis, agindo como verdadeiras sementes (RAVI & ANAND, 2012).

4. Metodologia

4.1 Obtenção dos ápices de batata cv. BRS Clara

O material vegetal foi proveniente da cultivar BRS Clara, pré-cultivada in vitro em meio nutritivo Murashige & Skoog (MURASHIGE & SKOOG, 1962) durante 26 dias em incubadora B.O.D., com fotoperíodo de 16 horas a $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ no Laboratório de Cultura de Tecidos, Embrapa Clima Temperado, no ano de 2014.

Ápices foram excisados em condições assépticas e foram transferidos para um pré-tratamento durante 39 horas em meio de cultura MS com metade da concentração de sais, acrescido de 0,3 M de sacarose (YAMAMOTO, 2012).

4.2 Encapsulamentos dos explantes

Para constituir o endosperma artificial das sementes sintéticas foi preparado o meio nutritivo MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) na solução de Cloreto de Cálcio, com 3% (p/v) de sacarose e adição de 5% (p/v) de Alginato de Sódio. Para a complexação foi preparado solução de $14,7 \text{ g L}^{-1}$ de Cloreto de Cálcio (adaptado de REDENBAUGH et al. 1993).

Ambas as soluções e os meios nutritivos foram regulados para pH 5,8 e autoclavados. A solução estéril de alginato é misturada com o explante em um pequeno recipiente de vidro, em condições estéreis em uma cabine de fluxo laminar, os explantes são sugados com uma micropipeta (com a ponteira cortada, de modo que se aumente o diâmetro para 2-4 mm) junto com a solução de alginato (Fig.2A). O alginato é então gotejado gota-a-gota, cada gota contendo um explante individual, na solução de Cloreto de Cálcio (Fig.2B), onde ocorre a reação de troca de íons no qual o cálcio substitui o sódio da cápsula. (LAMBARDI et al. 2006).

Após 30 minutos na solução de complexação é realizada a lavagem em água destilada estéril para remover os íons de cálcio em excesso (ONISHI *et al.*, 1994) e as cápsulas são submetidas a solução de crioproteção 0,8 M sacarose, juntamente com 2 M de glicerol (Fig.2C) por 30 minutos (HIRAI & SAKAI, 1999), lavadas novamente e prontas para etapa de vitrificação (Fig.2D).

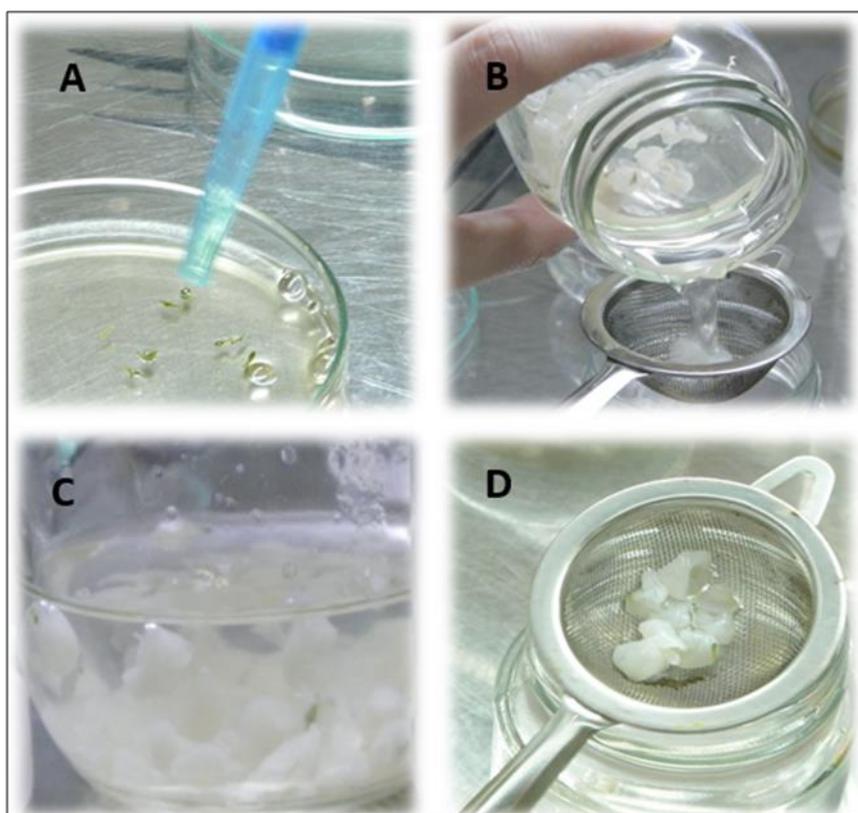


Figura 2 - Esquema de encapsulamento **A.** Ápices cv. BRS Clara em contato com solução de alginato 5% sendo resgatadas com micropipeta; **B.** Cápsulas sendo retidas da solução de Cloreto de Cálcio após 30 minutos; **C.** Cápsulas submetidas a meio de crioproteção por 30 minutos; **D.** Cápsulas a serem submetidas a vitrificação. Fotos: Daiane Vargas, Embrapa Clima Temperado, 2014.

4.3 Vitrificação

As cápsulas contendo os explantes foram submetidos a 6 tratamentos: cápsulas inoculadas diretamente em meio de recultivo MS (controle 1), cápsulas congeladas sem a presença da solução de vitrificação de plantas 2 – PVS2 (controle 2), e cápsulas imersas em PVS2 em criotubo de 2 mL (Fig.3A) e passadas diretamente para o congelamento sendo considerado tratamento 1 (Fig.3B),

e cápsulas submetidas a 20, 30 e 40 minutos a solução de PVS2 antes do congelamento (tratamento 2,3 e 4, respectivamente).

O delineamento experimental foi de 5 repetições com 5 explantes por tratamento. Totalizando 150 explantes em esquema fatorial 2x6 com análise no teste de médias Tukey ao nível de 5% de probabilidade.



Figura 3 – Vitrificação A. Imersão das cápsulas em PVS2; **B.** Criotubo contendo cápsulas imersas sendo encaminhado para congelamento em nitrogênio líquido. Fotos: Daniele Masiero, Embrapa Clima Temperado, 2014.

O congelamento foi realizado em nitrogênio líquido durante 1 hora e após as cápsulas foram lavadas com solução contendo 1M de sacarose (YAMAMOTO, 2012), passadas para o meio de recultivo MS e aclimatadas por 5 dias em ausência de luminosidade a temperatura de 24°C, decorrido esse tempo as mesmas foram transferidas para fotoperíodo de 16 h. As avaliações feitas foram percentual de viabilidade após 7, 14 e 21 dias de recultivo.

5. Resultados e Discussão

De acordo com os resultados obtidos (Tabela 1), foi possível confirmar que a exposição à solução de vitrificação de plantas é um passo determinante para o sucesso da técnica de criopreservação (Sakai & Engelmann, 2007), visto que os explantes controle (submetidos a congelamento sem a solução de PVS2), foram os que apresentaram a menor média, também houve diferença estatística de sobrevivência entre os diferentes tempos de imersão das cápsulas antes da vitrificação, corroborando com a ideia de SAKAI et al. (2004).

Tabela 1. Porcentagem de sobrevivência em ápices de batata cultivar BRS Clara, obtido através da técnica de encapsulamento-vitrificação, submetidos a diferentes tempos de imersão em solução de vitrificação de plantas. Embrapa, 2014.

Tratamentos	Sobrevivência (%)
Cápsulas não congeladas	92,00 a
Cápsulas submetidas a vitrificação sem PVS2	48,00 c
PVS2 – 0 minutos	100,00 a
PVS2 – 20 minutos	97,33 a
PVS2 – 30 minutos	73,33 b
PVS2 – 40 minutos	52,00 c
CV (%)	13,53
Pr ≥ Fc	0,0000

*Médias com diferentes letras nas colunas diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (<0,005).

A maior porcentagem de sobrevivência (100%) foi observada nas cápsulas em que o congelamento foi imediatamente após a imersão em PVS2 (Fig.4A), seguido pelo tratamento em que houve imersão dos explantes por 20 minutos antes da submissão ao nitrogênio líquido, que apresentou 97,33% (Fig.4B).

O que se assemelha ao estudo de Sakai et al. (2004) realizado com a mesma espécie, que demonstrou uma média de rebrota de 95% na exposição ao PVS2 por 10 minutos antes do congelamento e sugeriu determinada toxicidade do PVS2 aos explantes conforme aumento do tempo de exposição.

Halmagyi et al. (2005) testou 3 cultivares de batata (Desirée, Ostara e Santé) em relação ao efeito de desidratação do PVS2 em diferentes períodos, e apresentou média de viabilidade dos explantes entre 30 e 33% a exposição ao PVS2 durante 10 minutos, sendo considerado o melhor tratamento, mostrando decréscimo da média entre 13 e 19% aos 20 minutos.

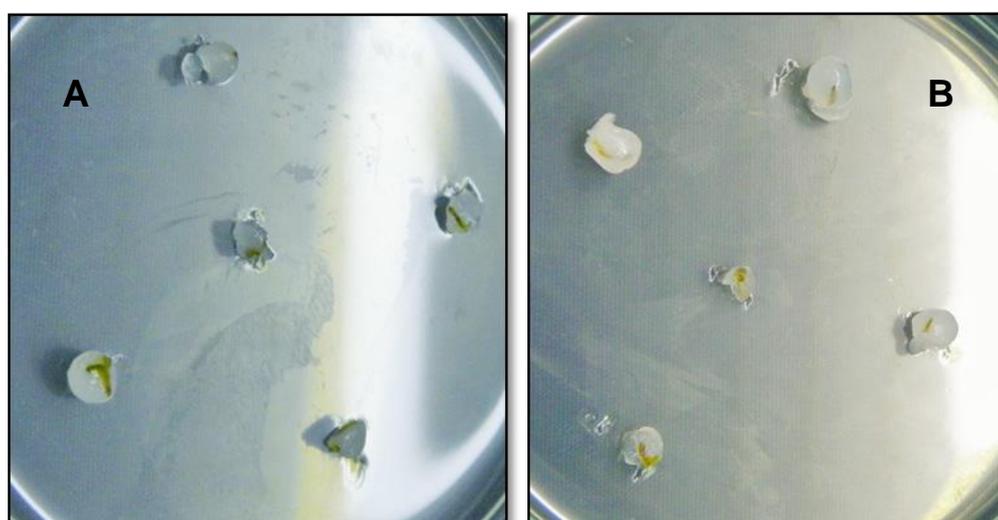


Figura 4 – Cápsulas pós vitrificação; **A.** Cápsulas quais o congelamento foi imediatamente após a imersão em PVS2 (T3); **B.** Cápsulas expostas por 20 minutos a PVS2 antes da vitrificação (T4). Fotos: Daniele Masiero, Embrapa Clima Temperado, 2014

O tratamento em que as cápsulas não passaram por vitrificação (Fig. 5) não diferiu significativamente dos tratamentos 3 e 4, apresentando média de 92% de viabilidade, e rebrota após duas semanas, provando que o protocolo de encapsulamento utilizado foi satisfatório sendo capaz de prover os nutrientes necessários possibilitando que o mesmo se desenvolvesse em uma nova planta (LAMBARDI *et al.* 2006).

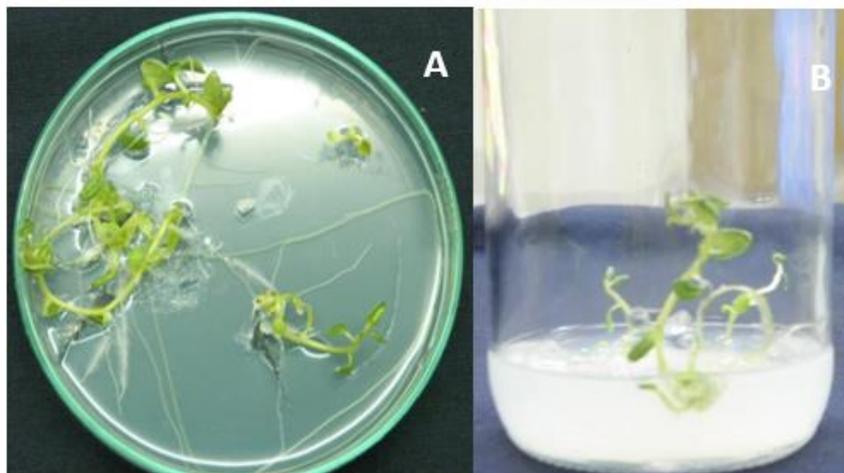


Figura 5 – Tratamento 1; **A** - Cápsulas não submetidas a vitrificação, apresentando rebrota; **B** - Planta transferida para frasco contendo meio de cultivo MS. Fotos: Daniele Masiero, Embrapa Clima Temperado, 2014

A menor média (48%), foi obtida no tratamento em que as cápsulas foram submetidas a congelamento sem uso da solução de vitrificação de plantas 2 (Fig.6A) e não diferiu estatisticamente do tratamento onde as cápsulas foram imersas por 40 minutos (Fig.6B) pré congelamento (52%), já o tratamento de 30 minutos (Fig.6C) apresentou uma média de viabilidade de 73%.

A escolha do explante, seguiu o estudo de Volk e Caspersen (2007), o qual apontou as células meristemáticas e as menos vacuoladas como as mais tolerantes ao tratamento com PVS2, por exibirem citoplasma mais denso e apresentarem baixos níveis de plasmólise e dano aparente. A baixa taxa de viabilidade de ápices caulinares após a criopreservação pode estar relacionada a diversos fatores como insuficiente tolerância osmótica da espécie, toxicidade do tempo de exposição à solução de vitrificação ou insuficiência da penetração da solução nos tecidos, ou inadequada desidratação dos explantes (CEJAS, *et al.*,2012).

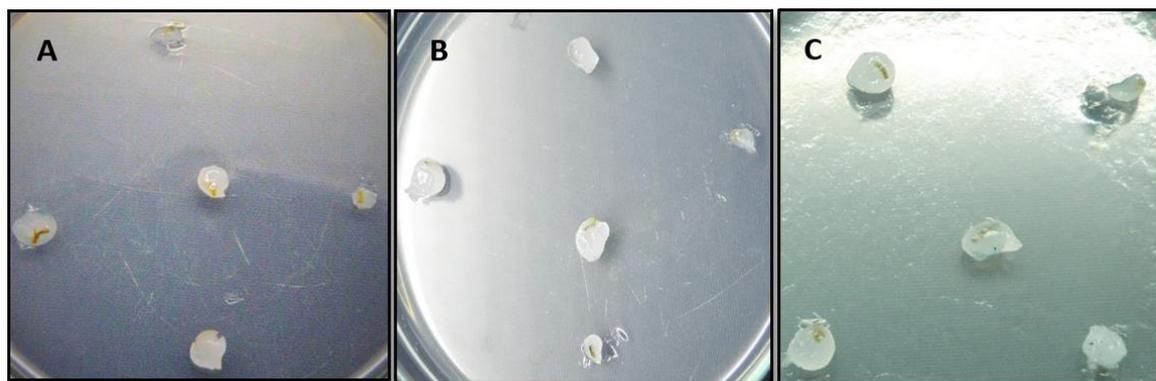


Figura 6 – Ápices encapsulados após vitrificação; **A**- 30 minutos em PVS2 (T5); **B**- 40 minutos em PVS2 (T6); **C**- Sem exposição ao PVS2 (T2). Fotos: Daniele Masiero, Embrapa Clima Temperado, 2014.

Algumas cultivares de batata são mais suscetíveis a toxicidade da solução de vitrificação demonstrando senescência em todos os explantes após 30 minutos de exposição (HALMAGYI et al., 2005). Towill e Jarret (1992), já haviam reportado que a exposição dos explantes a solução de vitrificação altamente concentrada por tempos maiores é potencialmente prejudicial devido aos efeitos fitotóxicos dos componentes individuais ou os seus efeitos osmóticos combinados sobre a viabilidade celular.

Em relação a exposição de 30 minutos Bai (2010), utilizando outro método de criopreservação, “Droplet-Method”, apontou apenas 30% de sobrevivência, podendo levar em consideração a eficiência do método utilizado no estudo, já que as médias se mostraram satisfatórias, sendo compatíveis com os dados divulgados por Shambu et al. (2009), que relatou a técnica de encapsulamento – vitrificação como a mais eficaz quando comparada com encapsulamento-desidratação e vitrificação-droplet, apresentando médias de sobrevivência de 52%, 44% e 36%, respectivamente, sugerindo que a matriz de alginato é uma maneira eficaz de proteger os explantes dos efeitos tóxicos do PVS2 (HIRAI E SAKAI, 2003).

Além disso, o encapsulamento-vitrificação exhibe outras vantagens quando comparado com o método de vitrificação convencional, já que este último exige a manipulação de ápices muito pequenos em uma suspensão, tornando o tempo de exposição ao PVS2 mais difícil de ser controlado, enquanto que os ápices encapsulados se tornam mais fáceis de manipular e permitem uma maior flexibilidade na manipulação de grandes quantidades de material, além da desidratação mais lenta e proteção mecânica do explante (SAKAI & HIRAI, 2003),

vindo a ser um método facilmente e eficientemente aplicável no contexto do banco de genes, onde grandes números de amostras precisam ser conservados rotineiramente.

No que diz respeito a viabilidade observada em de alguns dos explantes submetidos a vitrificação sem exposição ao PVS2 (Fig.7), podemos relacionar com a solução crioprotetora utilizada (0,8 M sacarose, juntamente com 2 M de glicerol) antes do uso do PVS2, a qual foi uma combinação baseada no estudo de Hirai e Sakai (1999), que relatou sobrevivência em 57% dos explantes. Onde o glicerol atua como um crioprotetor que penetra na membrana da célula reduzindo a concentração de água, e a sacarose atua penetrando a parede celular reduzindo a água pela plasmólise, ambos auxiliam no processo de vitrificação, diminuindo o estresse osmótico causado pelo PVS2 (KACZMARCZYK, et al., 2011).

Em relação ao tempo no recultivo após congelamento não houve diferença estatística entre os tratamentos e os intervalos de tempo avaliados (Figura 7),

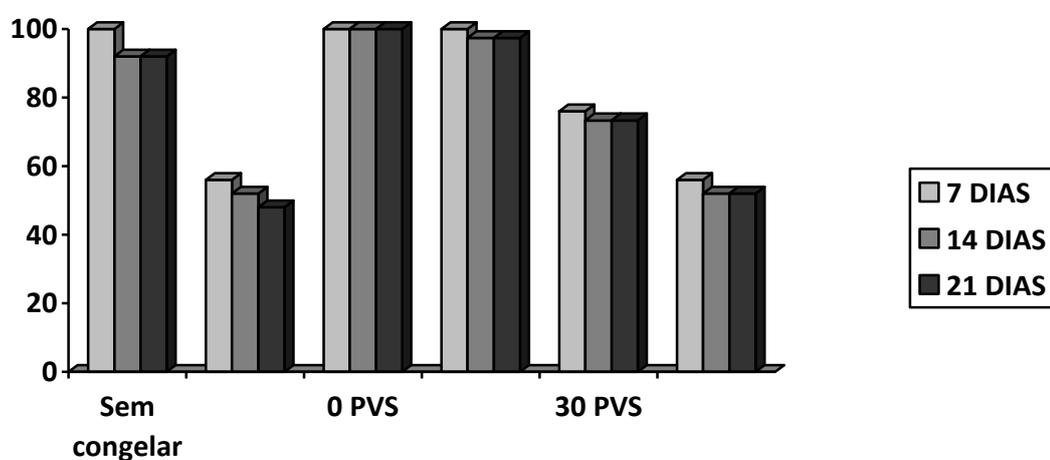


Figura 7 – Porcentagem de viabilidade dos explantes em relação aos tempos de avaliação, 7, 14 e 21 dias respectivamente.

Embora não tenha sido observada diferença estatística entre os diferentes tempos de avaliação, pode-se observar que o tratamento sem a utilização do PVS2 pré congelamento, foi o que apresentou maior senescência ao decorrer das avaliações, evidenciando ainda mais a importância da solução na proteção ao dano celular pós congelamento.

Ressalta-se também a presença de menor taxa de viabilidade tanto nos explantes sem submissão a solução de vitrificação, como aquelas que permaneceram mais tempo em contato com a mesma.

6 Conclusões e Perspectivas

Este estudo demonstrou que a utilização das técnicas de encapsulamento aliada a vitrificação é eficaz para a criopreservação de germoplasma de batata cv. BRS Clara, tendo apresentado uma média de sobrevivência elevada no congelamento imediato após a exposição a solução de vitrificação de plantas.

A técnica de encapsulamento-vitrificação pode ser considerada satisfatória, porém deverão ser realizadas mais avaliações quanto o potencial de rebrota desses explantes para confirmação do protocolo utilizado, além disso é necessário examinar a aplicabilidade e possível aperfeiçoamento do mesmo para utilização em outros genótipos de batata, assim como adaptação para outras espécies.

Referências

ANDRADE, V.C.; VIANA, D.J.S; FERNANDES, J.S.C; FIGUEIREDO, J.A.; NUNES, U.R.; NEIVA, I.P. Selection of sweet potato clones for the region Alto Vale do Jequitinhonha. **Horticultura Brasileira** vol.27, p.389-393, 2009.

ARNAO, M. T. G.; ENGELMANN, F. Cryopreservation of plant germplasm using the encapsulation-dehydration technique: review and case study on sugarcane. **CryoLetters** v.27, p. 155-168, 2006.

ASSIS, M. Novas tecnologias na propagação de batata. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.20, n.197, p.30-33, 1999.

BAI, J.; CHEN, X.; LU, X.; GUO, H.; XIN X.; ZHANG, Z.; XIN, P. Cryopreservation of *In Vitro* Shoot Tips of Potato by Droplet Vitrification and Genetic Stability of Regenerated Plantlets. **Acta Horticulturae Sinica**, v.37; p.1431–1438, 2010.

BAJAJ, Y. P. S.; SOPORY, S. K. Biotechnology of potato improvement. **Biotechnonology in agriculture and forestry**. Springer. p. 429-453, 1988.

BAJAJ, Y.P.S. Initiation of shoots and callus from potato-tuber sprouts and axillary buds frozen at -196°C. **Crop Improvement**, 4: 48-53. 1977.

BARANDALLA, L.; SANCHEZ, I.; RITTER, E.; GALARRETA, J. Conservation of potato (*Solanum tuberosum* L) cultivars by cryopreservation. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v.4, p.9-13, 2003.

BRYANT, G.; KOSTER, K. L.; WOLFE, J. Membrane behaviour in seeds and other systems at low water content: the various effects of solutes, **Seed Sci. Res.** v.11; p.17–25, 2001.

CAPUANO, G.; PICCIONI, E.; STANDARDI, A. Effect of different treatments on the conversion of M.26 apple rootstock synthetic seeds obtained from encapsulated apical and axillary micropropagated buds. **Journal Horticulture. Sci. Biotechnol.** v.73.p.299–305; 1998.

CEJAS, I.; VIVES, K.; LAUDAT, T.; GONZALEZ, J.; ENGELMANN, F.; MARTINEZ, M.; LORENZO, J. Effects of cryopreservation of *Phaseolus vulgaris* L. seeds on early stages of germination. **Plant Cell Reports**, v.31; p.2065-2073, 2012.

CID, L.P.B. Sementes Sintéticas: O desenvolvimento de sementes encapsuladas. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**. v.32. p.4-7, 2004.

CIP: International Potato Center. Consultative Group on International Agricultural Research, 2011. Disponível em cipotato.org/about-cip, acesso em 26 de setembro de 2014.

CROWE, J.H.; CROWE, L.F.; CHAPMAN, D. Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: The role of trehalose. **Science**, v.233; p.701-703, 1984.

DUTRA, L. F., MAYER, K. C. A., SILVA, N. D. G., NINO, A. F. P., SILVA, F. O. X. S., VIEIRA, F. C. B. Protocolos de Micropropagação de Plantas. I-Batata. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, **Embrapa Clima Temperado**, Documento 317. Novembro, 2010.

ENGELMANN, F. In vitro conservation methods. **Biotechnology and plant genetic resources** p. 119–161, 1997.

ENGELMANN, F. Importance of cryopreservation for the conservation of plant genetic resources. **Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm: Current Research Progress and Application**. p. 8-20, 2000;

ENGELMANN, F., GONZALEZ-ARNAO, M.T., WU, YONGJIE; ESCOBAR, R. Development of encapsulation-dehydration. **Plant Cryopreservation: a Practical Guide**. p.59-76. 2008.

FAHY, G.M., MACFARLANE, D.R., ANGELL, C.A.; MERYMAN, H.T. Vitrification as an approach to cryopreservation. **Cryobiology** v.21, 407-426, 1984.

FAHY, G.M. The relevance of cryoprotectant “toxicity” to cryobiology, **Cryobiology** v.23; p.1–13, 1986

FAO, disponível em: <http://www.potato2008.org/en/potato/>. Acesso em 26 de outubro de 2014

FORTES, G. R. L.; PREREIRA J. E. S. Batata – semente pré-básica: Cultura de Tecidos. O cultivo da batata na região sul do Brasil. Brasília: **Embrapa Informação Tecnológica**, p 421-433, 2003.

FRANKEL, O.H.; HAWKES, J.G. Dodds, J.H. Storage of Plant Genetic Resources. **Experiments in Plant Tissue Culture**. P.172-180, 1986.

FUJII, J. A.; SLADE, D. T., REDENBAUGH, K.; WALKER, K. A. Artificial seeds for plant propagation. **Tbitech**, v.5, p. 335-339, 1987.

FULLER, B.J. Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state, **Cryo Letters** v.25; p.375–388, 2004.

GARDI, T.; PICCOINI, E.; STANDARDI, A. Effect of bead nutrient composition on regrowth of stored vitro-derived encapsulated microcutting of different woody species. **J. Microencapsul.** v.16. p.13–25; 1999.

GROSPIETSCH, M.,; STODŮLKOVÁ. E.,; ZÁMEČNÍK, J; Effect of osmotic stress on the dehydration tolerance and cryopreservation of *Solanum tuberosum* shoot tips. **Cryo-Letters** v.20, p.339–346, 1999.

HALMAGYI A, DELIU C, COSTE A. Plant regrowth from potato shoot tips cryopreserved by a combined vitrification-droplet method. **Cryo-Letters** 26:313–322, 2005.

HARDING, K. Molecular stability of the ribosomal RNA genes in *Solanum tuberosum* plants recovered from slow growth and cryopreservation. **Euphytica** v.55, p. 141-146, 1991.

HAWKES J. G. Biosystematics of the potato. **The potato crop**. p. 15–69, 1978.

HAWKES, J. G. The potato: evolution, biodiversity and genetic resources. **American Potato Journal**, v.67, p. 733-735, 1990.

HIRAI, D.; A. SAKAI. Cryopreservation of *in vitro* grown meristems of potato (*Solanum tuberosum* L.) by encapsulation-vitrification, **Potato Research** v.42; p. 153-160, 1999.

HIRAI, D.; SAKAI A. Recovery Growth of Plants Cryopreserved by Encapsulation-Vitrification. **Cryo Letters** V.80, p.55-64, 2001.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**, Rio de Janeiro, v. 25, n. 2, p. 1-88, mar./2013.

KACZMARCZYK, A.; ROKKA, V. M.; KELLER E. R. J. Potato Shoot Tip Cryopreservation. A Review. **Potato Research** V.54, p.45–79, 2011.

KIM, H.H.; NO, N.Y.; SHIN, D.J.; KO, H.C.; KANG, J.H.; CHO, E.G.; ENGELMANN, F. Development of alternative plant vitrification solutions to be used in droplet vitrification procedures. **Acta Hort.** V.908, p.181-186, 2009.

KIM, H.H.; NO, N.Y.; SHIN, D.J.; KO, H.C.; KANG, J.H.; CHO, E.G.; ENGELMANN, F. Development of alternative plant vitrification solutions to be used in droplet vitrification procedures. **Acta Hort.** V.908, p.181-186, 2009.

KRYSZCZUK, A.; KELLER, J.; GRUBE, M.; GUZOWSKA, E. Z. Cryopreservation of potato (*Solanum tuberosum* L.) shoot tips using vitrification and droplet method. **Journal of Food Agriculture & Environment.** v.4 p. 196-200, 2006.

LAMBARDI, M.; BENELLI, C.; OZUDOGRU, E.; OZDEN-TOKATLI, Y. Synthetic seed Technology in Ornamental Plants. In: SILVA, Jaime A. Texeira. **Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology Volume II** p.347-354, 2006.

MAZUR, P. Principles of Cryobiology. **Life in the Frozen State**, p. 5-55, 2004.

MOREL, G. Meristem culture techniques for long term storage of cultivated plants. **Crop Genetic Resources for Today and Tomorrow.** P.327-332, 1975.

MURASHIGE T. Plant cell and organ culture as horticultural practice. **Acta Hortic.** v.78p.17-30, 1977.

NYENDE, A. B.; SCHITTENHELM, S.; MIX-WAGNER, G.; GREEF, J. R. Production, storability, and regeneration of shoot tips of potato (*Solanum tuberosum* L.) Encapsulated in calcium alginate hollow beads. **In Vitro Cell.** v. 39.p.540–544, 2003.

ONISH, Noboru; SAKAMOTO, Yuji; HIROSAWA, Takayasu. Sythetic seeds as an application of mass production of somatic embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture.** n. 39 p. 137-145, 1994.

PEREIRA A.S.; BERTONCINI O; SILVA G.O.; CASTRO C.M.; GOMES C.B.; HIRANO E; BORTOLETTO A.C.; MELO P.E; et al. BRS Clara: cultivar de batata para mercado fresco, com resistência à requeima. **Horticultura Brasileira.** v. 31.p. 664-668, 2013.

PEREIRA, A. S.; DANIELS, J. (eds). O cultivo da batata na região Sul do Brasil. Pelotas: Embrapa Clima Temperado; Brasília: **Embrapa Informação Tecnológica.** p. 17-45, 2010.

RAVI, Dhabhai; ANAND, Prakash. Production and Applications of Artificial Seeds: A **Seeds.** In: Redenbaugh K (Ed) Synseeds (pp 35-46). CRC Press, Boca Raton. 1993.

REDENBAUGH K, NICHOL J, KOSSLER ME, PAASCH B. Encapsulation of somatic embryos for artificial seed production. **In vitro Cell Dev. Biol. Plant.** v.20.p.256-257, 1984.

REDENBAUGH K.; FUJII J. A. & SLADE D. Hydrated Coatings for Synthetic **I. Res. J. Biological Sci.** v.1 n.5. p.74-78, 2012.

REED, B.M.; SCHUMACHER, L.; DUMET, D.; BENSON, E.E. Evaluation of a modified encapsulation-dehydration procedure incorporating sucrose pretreatments for the cryopreservation of ribes germplasm. **In Vitro Cell Dev. Biol.** v. 41.p.431-436, 2005.

ROCA, W.M. Tissue culture research at CIP. **Potato Journal**. Vol.52,p.281, 1975.
SAIPRASAD GVS, POLISETTY R (2003). Propagation of three orchid genera using encapsulated protocorm like bodies. **In vitro Cell Dev. Biol. Plant** v.39.p.42-48, 2003.

SAKAI, A.; KOBAYASHI, S.; OIYAMA, I. Survival by vitrification of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* var. *brasiliensis* Tanaka) cooled to -196°C , **J. Plant Physiol.** v.137; p.465–470, 1991.

SAKAI A.; HIRAI, D. Simplified cryopreservation of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) by optimizing conditions for osmoprotection. **Plant Cell Rep**, v.21; p.961–966, 2003.

SAKAI, A. Plant Cryopreservation. **Life in the Frozen State**, p.329-345, 2004.

SAKAI, A.; ENGELMANN, F. Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet vitrification: a review. **CryoLetters** v.28, p.151-172, 2007.

SCARIOT, A.O. SEVILLA, A.C. Conservação in situ de Recursos Genéticos Vegetais. In: NASS, L.L. (ed.). **Recursos Genéticos Vegetais**. Capítulo 14. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Brasília, p.474-509. 2007.

SHAMBHU P.; HIRA K. M.; HAK T. LIM. Preservation of *In Vitro* Grown Shoot Tips of Potato (*Solanum tuberosum* L.) by Different Methods of Cryopreservation. **Nepal Journal of Science and Technology** v.10; p.15-20, 2009.

SHERWINSKI-PEREIRA J.E.; COSTA F.H.S.; CAMILLO J.; SILVA D.B.; ALVES R.B.N.; VIEIRA R.F. Tissue cultures storage of Brazilian medicinal plants germoplasm. **Acta horticultrae**. v. 860, p. 211-241, 2010.

SILVA, G. O.; PEREIRA, A. S. Seleção em gerações iniciais para caracteres agrônômicos em batata. **Hortic. Bras.**, v. 29; n. 4; p.449-455, 2011.

SMIDSROD, O.; SKJAK-BREAK, G. Alginate as immobilization matrix for cells. **Tibtech**, v.8, p. 71-78, 1990.

TAKAGI, H. Recent development in cryopreservation of shoot apices of tropical species. **Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm: Current Research Progress and Application**, p.178-193, 2000.

TOWILL, L. E. & JARRET, R. L. Cryopreservation of sweet potato (*Ipomoea* Lam.) shoot tips by vitrification. **Plant Cell Reports** v.11, p.175–178, 1992.

VERÍSSIMO, A.; MOREIRA, A.; SAWYER D.; SANTOS, I.; PINTO, L.P. Biodiversidade na Amazônia Brasileira. **Instituto Socioambiental**. p.540, 2011.

VERTUCCI, C.W., BERJAK, P.; PAMMENTER, N.W.; CRANE, J. Cryopreservation of embryonic axes of an homoiohydrous (recalcitrant) seed in relation to calorimetric properties of tissue water, **Cryo Letters** v.12; p.339–350, 1991.

VOLK, M.; WALTERS, C. Plant vitrification solution 2 lowers water content and alters freezing behavior in shoot tips during cryoprotection **Cryobiology** v.52; p.48–61, 2006.

VOLK, G.M.; CASPERSEN, A.M. Plasmolysis and recovery of different cell types in cryoprotected shoot tips of *Mentha x piperita*. **Protoplasma** v.231; p.215-226, 2007.

WILKINS, C.P.; J.H. DODDS. The application of tissue culture techniques to plant genetic conservation. **Sci Prog**. Vol.68,p.281-307, 1983.

WITHERS, L.A. Long-Term Storage of *In Vitro* Cultures. **In vitro Techniques: Propagation and Long Term Storage**. p.137-148, 1985. WOLFE, J.; BRYANT, G.; KOSTER, K. L. What is 'unfreezable water', how unfreezable is it and how much is there? **Cryo Letters** v.23; p.157–166, 2002.

YAMAMOTO, S.; FUKUI, K.; NIINO T. Cryopreservation of in vitro shoot tips of potato varieties by V- Cryo-plate method. **Cryobiology** p.363, 2012.