

Criopreservação: uma ferramenta para conservação de recursos genéticos de videira

Jean Carlos Bettoni¹

Resumo—A conservação de recursos genéticos vegetais é fundamental para o desenvolvimento da agricultura. O desenvolvimento de protocolos eficientes de criopreservação tornou-se uma ferramenta eficaz para conservar espécies vegetais propagadas vegetativamente. Tradicionalmente, os recursos genéticos de videiras têm sido mantidos principalmente em coleções no campo. Como coleções no campo, os acessos de *Vitis* são vulneráveis a estresses abióticos e ameaças bióticas, como patógenos e pragas. Assim, quando métodos robustos de criopreservação estão disponíveis, há uma oportunidade para preservar coleções por longos períodos de tempo, com segurança e com baixo custo de manutenção. Vários métodos têm sido descritos para *Vitis* e, até agora, a vitrificação em gotas tem sido o mais efetivo para várias espécies de videira e parece ser um método promissor para superar as respostas específicas de genótipos/espécies para um determinado protocolo que tem sido o gargalo para o uso generalizado da criopreservação de *Vitis*. Esse artigo de revisão apresenta informações atualizadas e relevantes sobre o uso da criopreservação como ferramenta complementar para a conservação de recursos genéticos de videira.

Termos para indexação: *Vitis*; banco de germoplasma; cultura *in vitro*; armazenamento a longo prazo.

Cryopreservation: a tool for conservation of grapevine genetic resources

Abstract – Plant genetic resources conservation is essential for the development of agriculture. The development of efficient cryopreservation protocols has become an effective tool to conserve vegetatively propagated plant species. Traditionally, genetic resources have been maintained primarily in field collections. As field collections, *Vitis* accessions are vulnerable to abiotic stresses and biotic threats, such as pathogens and pests. Thus, the availability of robust cryopreservation methods is an opportunity to preserve collections for long periods, safely and with low maintenance costs. Several cryopreservation methods have been described for grapevines and, so far, droplet-vitrification has been the most effective for multiple *Vitis* species. This method seems to be promising to overcome species- and genotype-specific responses to a determined protocol, factors that have been bottlenecks for the widespread use of *Vitis* cryopreservation. This review article presents updated and relevant information on the use of cryopreservation as a complementary tool for the conservation of *Vitis* genetic resources.

Index terms: *Vitis*; germplasm bank; *in vitro* culture; long-term storage.

Introdução

A cadeia produtiva da videira possui inserção destacada no cenário mundial da fruticultura e a planta está entre as mais importantes fruteiras de clima temperado cultivadas e consumidas no mundo. Em 2017, a área de cultivo foi de 7,53 milhões de hectares produzindo 73,3 milhões de toneladas de uvas (OIV, 2018). Em todo o mundo, existem mais de 70 espécies dentro do gênero *Vitis*, com muitos dos cultivares comercialmente importantes atribuídas a *Vitis vinifera* (LI et al., 2017). No entan-

to, outras espécies de *Vitis*, tais como *V. labrusca*, *V. berlandieri*, *V. riparia*, *V. rupestris*, e *Muscadinia rotundifolia* (gênero *Muscadinia*) são importantes para programas de melhoramento genético focados no desenvolvimento de novos cultivares e porta-enxertos tolerantes/resistentes a pragas e doenças e adaptados a diversas condições ambientais (CARIMI et al., 2016; SMITH et al., 2016). Para tanto, a manutenção e o fácil acesso aos recursos genéticos de videira são essenciais para futuros avanços de programas de melhoramento (BI et al., 2018a; BETTONI, 2018).

Bancos de germoplasma (BAGs) de videira no Brasil

Atualmente, o Brasil mantém a maior coleção de germoplasma de *Vitis* na América do Sul, com aproximadamente 1400 acessos, que incluem cultivares, híbridos interespecíficos e espécies silvestres. O BAG de videira é mantido no estado do Rio Grande do Sul, em Bento Gonçalves, na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) Uva e Vinho. A coleção inclui 655 acessos de *V. vinifera*, 64 acessos de *V. labrusca* e híbridos e 561 acessos de

Recebido em 5/12/2018. Aceito para publicação em 17/1/2019.

¹ Engenheiro-agrônomo, Dr., Oak Ridge Institute for Science and Education/USDA-ARS-Plant Germplasm Preservation Research Unit, 1111 South Mason Street, 80521, Fort Collins, CO, e-mail: jcbettoni@gmail.com

<http://dx.doi.org/10.22491/RAC.2019.v32n2.14>

híbridos interespecíficos (MAIA et al., 2015). Na Região Nordeste do país, a Embrapa Semiárido mantém aproximadamente 267 acessos de videira conservados, composto por 168 cultivares de *V. vinifera*, 8 cultivares de *V. labrusca*, 73 híbridos interespecíficos, 8 espécies silvestres americanas, além de 10 acessos sem informação sobre origem (NUNES et al., 2015). Outras coleções com menor número de acessos são mantidas por empresas de pesquisa nacional nos estados de Santa Catarina (Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina [Epagri]), Minas Gerais (Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais [Epamig]), São Paulo (Instituto Agrônomo de Campinas [IAC]) e Paraná (Instituto Agrônomo do Paraná [Iapar]) (MAIA et al., 2015).

Estratégias complementares para a conservação de recursos genéticos

Para a conservação de recursos genéticos vegetais existem dois métodos complementares de conservação, nomeadas como conservação *in situ* e *ex situ* (DULLOO et al., 2010; BENELLI et al., 2013; BETTONI, 2018). A conservação *in situ* consiste na manutenção do recurso vegetal no ambiente natural de origem, preservando a organização do ecossistema. Por outro lado, a conservação *ex situ* é a manutenção do recurso genético fora do ambiente natural e geralmente é utilizada para proteger coleções de plantas de uma potencial ameaça de perda para futura utilização (BOROKINI, 2013).

Nas últimas décadas, esforços consideráveis foram realizados em todo o mundo para implementação de BAGs com o objetivo principal de conservar recursos genéticos fundamentais para a segurança alimentar e tentar minimizar os efeitos da antropização e da erosão genética. Tradicionalmente, coleções de plantas mantidas a campo, em casa de vegetação e em cultura de tecidos *in vitro* têm sido utilizadas para preservar germoplasma de videira (MAIA et

al., 2015). A manutenção de plantas no campo é dispendiosa, requer extensiva área plantada, além da vulnerabilidade a estresses bióticos e abióticos (PATHIRANA et al., 2016). A manutenção de bancos *in vitro* requer frequentes manuseios de culturas, o que resulta em uma elevação de custos, risco de perda do acesso vegetal e principalmente apresenta potencial para gerar variação somaclonal (MATHEW et al., 2018; WANG et al., 2014). Neste sentido, outras estratégias de conservação *ex situ* para os recursos genéticos de plantas devem ser consideradas que, além da manutenção do material vegetal por longos períodos de tempo, preservem a estabilidade genética durante o armazenamento.

Criopreservação de videira

A criopreservação de plantas, que consiste no armazenamento de material biológico a temperaturas ultrabaixas em nitrogênio líquido (NL, -196°C) ou vapor de nitrogênio líquido (VNL, -160°C para -196°C), é um método complementar para os tradicionais métodos de conservação de germoplasma a campo e *in vitro*, permitindo que recursos vegetais sejam preservados de forma segura, em um espaço reduzido e com mínima manutenção (BETTONI, 2018; ENGELMANN, 2011; BENSON, 2008). Nas últimas décadas, estudos de criopreservação têm evoluído em vários gêneros de plantas e, atualmente, tem sido considerado um método preferido para conservação a longo prazo de material vegetal, principalmente pela manutenção da integridade genética de materiais criopreservados (BI et al., 2017; REED, 2017).

Metodologias práticas e confiáveis de criopreservação que resultem em altos níveis de regeneração ($\geq 40\%$) após a exposição ao NL, associadas ao fácil acesso e transferência dessas tecnologias entre laboratórios, é a chave para o uso generalizado da criopreservação e o desenvolvimento de coleções de plantas criopreservadas (VOLK et al., 2016).

Como fonte de material biológico para a criopreservação pode ser utilizado qualquer tecido totipotente (REED, 2017); porém, em procedimentos clonais de criopreservação, a integridade clonal é necessária. Dessa forma, tecidos organizados como meristemas ou gemas dormentes são preferíveis, principalmente, quando o objetivo é manter as características da planta matriz (BI et al., 2017; WANG et al., 2014).

Atualmente, a criopreservação de rotina está disponível para várias espécies de plantas, e BAGs de plantas criopreservadas têm sido implementados em todo o mundo. Até o momento, existem vários relatos na literatura sobre protocolos de criopreservação em *Vitis* (BI et al., 2017). Os primeiros trabalhos da aplicação da criopreservação em explantes de videira foram na década de 1990, com a técnica de encapsulação-desidratação e, nos anos seguintes, outros trabalhos foram realizados com a mesma técnica (PLESSIS et al., 1991, 1993; WANG et al., 2000; WANG et al., 2003a; BAYATI et al., 2011; MARKOVIĆ et al., 2013). Outros protocolos ou técnicas também foram investigados: vitrificação (MATSUMOTO & SAKAI, 2003; WANG et al., 2003a; GANINO et al., 2012), encapsulamento-vitrificação (BENELLI et al., 2003; GRIBAUDO et al., 2012) e, mais recentemente, vitrificação em gotas (MARKOVIĆ et al., 2013; PATHIRANA et al., 2016; BI et al., 2018a; VOLK et al., 2018; BETTONI et al., 2018a; BETTONI et al., 2019a, 2019b) e V crioplasca (BETTONI et al., 2019b). Informações detalhadas sobre protocolos de criopreservação aplicados para videira podem ser encontradas em artigos de revisão publicados recentemente por Marković et al. (2018), Bi et al. (2017) e Bettoni et al. (2016).

Apesar dos vários protocolos de criopreservação de videira disponíveis, criobancos de *Vitis* spp. ainda não têm sido implementados. Algumas publicações demonstram baixos níveis de regeneração após a exposição em NL (GANINO et al., 2012; BENELLI et al., 2003) e, em grande parte destas, os pesquisado-▶

res se concentraram no desenvolvimento de procedimentos usando um número limitado de espécies (BI et al., 2017; BETTONI et al., 2016). Associado a tudo isso, está o principal fator que ainda limita a implementação de criobancos de videira: a especificidade de genótipos para um determinado protocolo (BI et al., 2017; PATHIRANA et al., 2016; BENELLI et al., 2013; BENSON, 2008). Assim, pesquisas futuras devem focar no desenvolvimento de protocolos que sejam aplicáveis para várias espécies, visando facilitar a criação de criobancos de videira.

Ao longo dos anos, muitas técnicas de criopreservação foram publicadas, como relatado anteriormente; entre elas, até agora, a técnica de vitrificação em gotas mostrou-se a mais eficiente e é considerada promissora para superar as respostas específicas de espécies e genótipos a um determinado protocolo (VOLK et al., 2018; BI et al., 2018a). Recentemente, melhorias nos protocolos de vitrificação em gotas para a criopreservação de *Vitis* foram publicadas, e estas estão associadas à melhoria da qualidade do explante (MARKOVIĆ et al., 2014), das condições de pré-tratamento, com a adição de antioxidantes e eliciadores de proteínas de defesa (PATHIRANA et al., 2016; BI et al., 2018a; VOLK et al., 2018; BETTONI et al., 2019a, 2019b) e do meio de regeneração após a criopreservação (VOLK et al., 2018). Volk et al. (2018) relataram um método de vitrificação em gotas aplicado com sucesso para nove espécies de videira com regeneração média de $35 \pm 2\%$ após a exposição dos meristemas ao NL. O método desenvolvido (usando nove espécies de videira) inclui as etapas de pré-tratamento de segmentos nodais em meio basal MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) contendo $0,2\text{mg L}^{-1}$ de 6-Benzilaminopurina, $0,1\text{mM}$ de ácido salicílico, 1mM de glutatona reduzida e 1mM de ácido ascórbico por duas semanas, seguido por pré-cultivo de explantes em meio basal MS suplementado com $0,3\text{M}$ de sacarose por três dias antes do tratamento em solução de

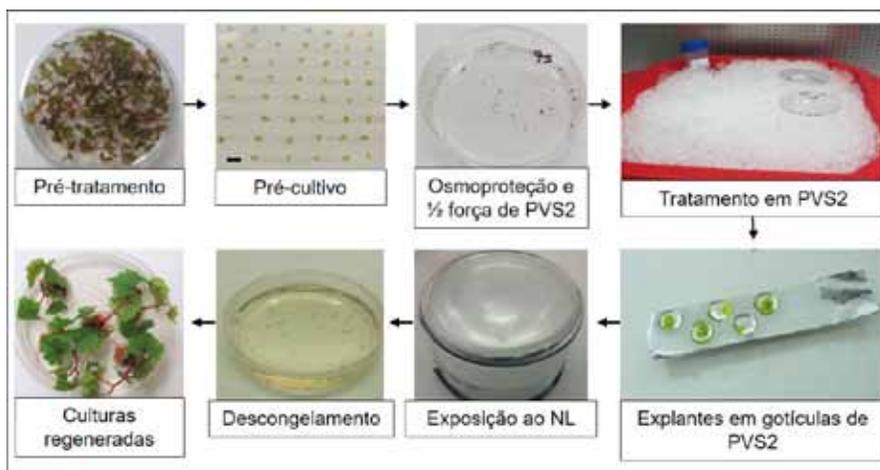


Figura 1. Principais etapas no procedimento de vitrificação em gotas para criopreservação de explantes de *Vitis* spp. Barra de escala na etapa de pré-cultivo: 2 mm. Fonte: elaboração do autor

Figure 1. Main steps in droplet-vitrification procedure for cryopreservation of *Vitis* spp. explants. Scale bar in the preculture step: 2 mm. Source: prepared by the author

osmoproteção ($\frac{1}{2}$ MS + 2M de glicerol + $0,4\text{M}$ de sacarose) por 20 minutos e meia força de solução vitrificação de planta 2 (PVS2) (SAKAI et al., 1990) por 30 minutos a 22°C , seguido de 90 minutos de exposição ao PVS2 a 0°C e transferência dos explantes para gotículas de solução de PVS2 sobre tiras de papel alumínio antes do tratamento em NL, descongelamento em solução de lavagem ($\frac{1}{2}\text{MS}$ + $1,2\text{M}$ de sacarose) por 20 minutos a 22°C e cultivo dos explantes em meio de regeneração. As principais etapas da criopreservação de *Vitis* spp. pela técnica de vitrificação em gotas são apresentadas na Figura 1.

Foi comprovado que a criopreservação poderá ir além da conservação de material biológico, já que tecidos *in vitro* inicialmente infectados por vírus, quando criopreservados, regeneram plantas saudáveis (BETTONI et al., 2019c; BI et al., 2018b; BETTONI et al., 2018b; BETTONI et al., 2016; PATHIRANA et al., 2015). Assim surgiu a denominação crioterapia, que se refere ao breve tratamento de explantes em NL para eliminar patógenos de plantas, como vírus, fitoplasmas e bactérias (BETTONI & SOUZA, 2018). Até à data, cinco das principais viroses da videira, incluindo *Grapevine leafroll associated virus-1* (GLRaV-1), GLRaV-2, GLRaV-3, *Grapevine virus A*

(GVA) e *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) têm sido eliminadas de videiras usando técnicas de crioterapia (BI et al., 2018b; PATHIRANA et al., 2015; MARKOVIĆ et al., 2015; BAYATI et al., 2011; WANG et al., 2003b).

Fatores-chave que afetam a eficiência de procedimentos de criopreservação

Nas últimas décadas, pesquisadores de todo o mundo buscam estratégias para otimizar os métodos de criopreservação. Dentre os fatores que são entendidos como determinantes para o sucesso de um protocolo de criopreservação está a qualidade do material que será submetido ao procedimento criogênico. Assim, o estado fisiológico adequado é um pré-requisito de plantas que serão doadoras de explantes (MARKOVIĆ et al., 2014; ENGELMANN, 2011).

Durante a criopreservação, os explantes são submetidos a uma série de etapas como excisão, lesão osmótica, dessecação e tratamento a ultrabaixa temperatura. Esses procedimentos impõem estresse ao material vegetal, devido à produção de espécies reativas de oxigênio que causam danos oxidativos e podem tornar o maquinário celular inviável (MATHEW et al., 2018). Uma

abordagem recente que vem sendo estudada é adição de antioxidantes (ácido salicílico, ácido ascórbico) em meios de cultura onde são cultivadas as plantas doadoras de explantes (PATHIRANA et al., 2016) e em meios de cultura durante as etapas da criopreservação (VOLK et al., 2018). O efeito positivo da adição de agentes antioxidantes ou compostos antiestresse tem sido observado na melhoria do crescimento e desenvolvimento das plantas de videira após a exposição ao NL (VOLK et al., 2018; BETTONI et al., 2019a; PATHIRANA et al., 2016). Dessa forma, esses componentes possivelmente estarão presentes em pesquisas futuras com criopreservação.

O sucesso de protocolos de criopreservação está ligado principalmente ao status hídrico que o material biológico apresenta antes do tratamento em NL (BETTONI et al., 2016). Alguns materiais, como sementes ortodoxas, gemas dormentes e pólen, passam por um processo de desidratação natural no ambiente, sendo passíveis de criopreservação sem nenhum pré-tratamento, porém, a maioria dos materiais biológicos que são submetidos à criopreservação possuem alto conteúdo de água, o que os torna extremamente sensíveis ao congelamento (ENGELMANN, 2011). Neste sentido, duas principais estratégias de criopreservação para tecidos de plantas são comumente utilizadas: adição de soluções vitrificantes, como PVS2 (SAKAI et al., 1990), que fazem com que a água livre presente nos tecidos sofra uma transição da fase líquida para um estado vítreo, evitando a formação de cristais de gelo quando o material é exposto ao NL (FAHY et al., 1984); e remoção de parte da água das células por meio da desidratação de explantes encapsulados ao ar em câmara de fluxo laminar ou em sílica gel (MARKOVIĆ et al., 2013). Ambas as abordagens têm o mesmo objetivo de reduzir ou impedir a formação de cristais de gelo nos tecidos (BETTONI et al., 2016; ENGELMANN, 2014). Dessa forma, o maior desafio é encontrar um equilíbrio na desidrata-

ção, de modo que não ocorram danos nos tecidos promovidos por uma retirada excessiva da água ou efeitos deletérios causados pela formação de cristais de gelo no interior da célula durante o congelamento, que causam ruptura do sistema de membranas celulares e, assim, colapso e morte de células (MATSUMOTO, 2017) ou toxicidade causada pela exposição excessiva à soluções vitrificantes (GANINO et al., 2012; SAKAI et al., 2000).

Além do status fisiológico das plantas doadoras de explantes, adição de antioxidantes e status hídrico do material biológico, o funcionamento de protocolos de criopreservação depende, também, da definição de meio adequado de regeneração (BI et al., 2017; BETTONI et al., 2016). Torna-se imprescindível que, anterior à aplicação de técnicas de criopreservação, a rota de multiplicação do material esteja estabelecida, de modo que não ocorram problemas de regeneração resultantes da utilização de um protocolo de regeneração inadequado. O uso de reguladores de crescimento em meios de regeneração, mesmo quando utilizado em pequenas concentrações, tem-se mostrado fundamental. A adição de citocininas em combinação ou não com auxinas teve efeito positivo no desenvolvimento de explantes de várias espécies de plantas, dentre elas a videira (MARCOVIĆ et al., 2014; WANG et al., 2003a). No entanto, quando esses reguladores de crescimento são utilizados em concentrações inadequadas podem estimular o desenvolvimento de calos (WANG et al., 2000). A capacidade de regeneração das culturas por meio de crescimento direto de estrutura diferenciada, sem o desenvolvimento de calo, é fundamental para evitar problemas de variação somaclonal, garantindo assim a fidelidade genética do clone, principalmente quando se utilizam estruturas diferenciadas como fonte de explante (MATSUMOTO, 2017; HARDING, 2004). Sendo assim, é evidente que ensaios de criopreservação bem-sucedidos são dependentes de protocolos de cultura de tecidos bem

estabelecidos. Assim, qualquer espécie que possui um protocolo de cultura de tecidos funcional pode ser passível de criopreservação (ENGELMANN, 2011, 2014).

Considerações finais e perspectivas

Condições recentemente otimizadas em protocolos de criopreservação de videira relacionadas à melhoria no pré-tratamento e na qualidade de explantes e do meio de regeneração após a criopreservação, especificamente as relacionadas com a técnica de vitrificação em gotas, deverão superar os desafios atuais para a implementação de BAGs de *Vitis* spp. criopreservadas. A disponibilidade de métodos de criopreservação para *Vitis* spp. também pode facilitar o uso de técnicas de crioterapia para erradicar viroses, os quais serão determinados por trabalhos futuros quanto à efetividade dessas técnicas na erradicação de viroses que acometem a cultura da videira.

É importante destacar a necessidade de órgãos públicos ligados à fruticultura fomentarem pesquisas aplicadas em biotecnologias de criopreservação e crioterapia, visando a manutenção de bancos de germoplasmas e a produção de material propagativo de alta qualidade fitossanitária.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pelas bolsas de doutorado no país e de doutorado sanduíche no exterior (PDSE) para realizar pesquisas com criopreservação de videira no USDA-ARS, National Laboratory for Genetic Resources Preservation (NLGRP) em Fort Collins, Colorado, EUA. À Dra. Gayle Volk (NLGRP), Remi Bonnart (NLGRP), Ashley Shepherd (NLGRP), Juliana Aparecida Souza (Universidade do Estado de Santa Catarina [Udesc]) pelo apoio técnico nas pesquisas com criopreservação. ►

Referências

- BAYATI, S.; SHAMS-BAKHS, M.; MOIENI, A. Elimination of *Grapevine virus a* (GVA) by cryotherapy and electrotherapy. **Journal of Agricultural Science and Technology**, Tehran, v.13, p. 443-450, 2011.
- BENELLI, C.; DE CARLO, A.; ENGELMANN, F. Recent advances in the cryopreservation of shoot-derived germplasm of economically important fruit trees of *Actinidia*, *Diospyros*, *Mallus*, *Olea*, *Prunus*, *Pyrus* and *Vitis*. **Biotechnology Advances**, New York, v. 31, p. 175-185, 2013.
- BENELLI, C.; LAMBARDI, M.; FABBRI, A. Low temperature storage and cryopreservation of the grape rootstock Kober 5BB. **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 623, p. 249-253, 2003.
- BENSON, E. E. Cryopreservation of phytodiversity: a critical appraisal of theory & practice. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Abingdon, v. 27, p. 141-219, 2008.
- BETTONI, J. C.; SOUZA, J. A. Crioterapia: uma potencial ferramenta para erradicação de vírus em plantas. **Revista Agronomia Brasileira**, Jaboticabal, v. 2, n. 2, p. 1-3, 2018.
- BETTONI, J. C.; BONNART, R.; SHEPHERD, A.; KRETZSCHMAR, A. A.; VOLK, G. M. The development of a droplet-vitrification method to conserve *Vitis* collections in the USDA-ARS National Plant Germplasm System and UDESC-CAV Santa Catarina State University in Brasil. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON PLANT CRYOPRESERVATION, 3., 2018, Bangkok. **Anais [...]** Bangkok: Mahidol University, 2018a. p. 24.
- BETTONI, J. C.; DALLA COSTA, M.; SOUZA, J. A.; VOLK, G. M.; NICKEL, O.; SILVA, F. N.; KRETZSCHMAR, A. A. Cryotherapy by encapsulation-dehydration is effective for *in vitro* eradication of latent viruses from 'Marubakaido' apple rootstock. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 269, p. 1-7, 2018b.
- BETTONI, J. C.; DALLA COSTA, M.; GARDIN, J. P. P.; KRETZSCHMAR, A. A.; PATHIRANA, R. Cryotherapy: a new technique to obtain grapevine plants free of viruses. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 38, p.1-13, 2016.
- BETTONI, J. C. **Criopreservação para formação de banco de segurança em videira e crioterapia para erradicação de vírus em macieira**. 2018. 195f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Centro de Ciências Agroveterinárias, Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2018.
- BETTONI, J. C.; BONNART, R.; SHEPHERD, A. N.; KRETZSCHMAR, A. A.; VOLK, G. M. Successful cryopreservation of *Vitis vinifera* cv. 'Chardonnay' from both *in vitro* and growth chamber source plants. **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 1234, p. 211-218, 2019a.
- A.; VOLK, G. M. Modifications to a *Vitis* shoot tip cryopreservation procedure: effect of shoot tip size and use of Cryoplates. **CryoLetters**, Lewes, v. 40, p. 103-112, 2019b.
- BETTONI, J. C.; SOUZA, J. A.; VOLK, G. M.; DALLA COSTA, M.; SILVA, F. N.; KRETZSCHMAR, A. A. Eradication of latent viruses from apple cultivar 'Monalisa' shoot tips using droplet-vitrification cryotherapy. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 250, p. 12-18, 2019c.
- BI, W. L.; HAO, X. Y.; CUI, X. H.; VOLK, G. M.; WANG, Q. C. Droplet-vitrification cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of grapevine (*Vitis* spp.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology** – Plant, New York, v. 54, p. 590-599, 2018a.
- BI, W.; HAO, X. Y.; CUI, Z. H.; PATHIRANA, R.; VOLK, G. M.; WANG, Q. C. Shoot tip cryotherapy for efficient eradication of Grapevine leafroll-1 associated 2 virus-3 from diseased grapevine *in vitro* plants. **Annals of Applied Biology**, Oxford, v. 173, p. 261-270, 2018b.
- BI, W. L.; PAN, C.; HAO, X. Y.; CUI, Z. H.; KHER, M. M.; MARKOVIĆ, Z.; WANG, Q. C.; SILVA, J. A. T. Cryopreservation of grapevine (*Vitis* spp.): a review. **In Vitro Cellular & Developmental Biology**: Plant, New York, v. 53, p. 449-460, 2017.
- BOROKINI, T. I. The state of *ex-situ* conservation in Nigeria. **International Journal of Conservation Science**, Iași, v. 4, p. 197-212, 2013.
- CARIMI, F.; CARRA, A.; PANIS, B.; PATHIRANA, R. Strategies for conservation of endangered wild grapevine (*Vitis vinifera* L. subsp. *sylvestris* (C.C. Gmel.) Hegi). **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 1115, p. 81-86, 2016.
- DULLOO, M. E.; HUNTER, D.; BORELLI, T. *Ex situ* and *in situ* conservation of agricultural biodiversity: major advances and research needs. **Notulae Botanicae Horti Agrobotici Cluj-Napoca**, Cluj-Napoca, v. 38, p. 123-135, 2010.
- ENGELMANN, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. **In Vitro Cellular & Developmental Biology**: Plant, New York, v. 47, p. 5-16, 2011.
- ENGELMANN, F. Cryopreservation of clonal crops: a review of key parameters. **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 1039, p. 31-39, 2014.
- FAHY, G. M.; MACFARLANE, D. R.; ANGELL, C. A.; MERYMAN, H. T. Vitrification as an approach to cryopreservation. **Cryobiology**, Atlanta, v. 21, p. 413-426, 1984.
- GANINO, T.; SILVANINI, A.; BEGHÉ, D.; BENELLI, C.; LAMBARDI, M.; FABBRI, A. Anatomy and osmotic potential of the *Vitis* rootstock shoot tips recalcitrant to cryopreservation. **Biologia Plantarum**, Dordrecht, v.56, p. 78-82, 2012.
- GRIBAUDO, I.; CUOZZO, D.; GAMBINO, G.; VALLANIA, R. Applicazione della tecnica di incapsulazione-vitrificazione per la crioconservazione e la crioterapia in vite. **Acta Italica Hortus**, Firenze, v. 3, p. 372-374, 2012.
- HARDING, K. Genetic integrity of cryopreserved plant cells: a review. **CryoLetters**, Lewes, v. 25, p. 3-22, 2004.
- LI, B.; JIANG, J.; FAN, X.; ZHANG, Y.; SUN, H.; ZHANG, G.; LIU, C. Molecular characterization of chinese grape landraces (*Vitis* L.) using microsatellite DNA markers. **HortScience**, St. Joseph, v. 52, n. 4, p. 533-540, 2017.
- MAIA, J. D. G.; CARMARGO, U. A.; TONIETTO, J.; ZANUS, M. C.; QUECINI, V.; FERREIRA, M. E.; RITSCHER, P. Grapevine breeding programs in Brazil. In: REYNOLDS, A. (Ed.). **Grapevine breeding programs for the wine industry-traditional and molecular techniques**. Sawston: Woodhead Publishing, 2015. p. 247-271.

- MARKOVIĆ, Z.; PREINER, D.; STUPIĆ, D.; ANDABAKA, Ž.; ŠIKUTEN, I.; KONTIĆ, J. K.; MALETIĆ, E.; ŠTAMBUK, P. Cryopreservation protocols for grapevine shoot tips. *In: BOZKURT, Y. (Ed.). Cryopreservation biotechnology in biomedical and biological sciences.* London: IntechOpen, 2018. p. 131-142.
- MARKOVIĆ, Z.; PREINER, D.; STUPIĆ, D.; ANDABAKA, Ž.; ŠIMON, S.; VONČINA, D.; MALETIĆ, E.; KAROGLAN KONTIĆ, J.; CHATELET, P.; ENGELMANN, F. Cryopreservation and cryotherapy of grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Vitis*, Quedlinburg, v. 54, p. 247-251, 2015.
- MARKOVIĆ, Z.; CHATELET, P.; PREINER, D.; SYLVESTRE, I.; KONTIĆ, J. K.; ENGELMANN, F. Effect of shooting medium and source of material on grapevine (*Vitis vinifera* L.) shoot tip recovery after cryopreservation. *CryoLetters*, Lewes, v. 35, p. 40-47, 2014.
- MARKOVIĆ, Z.; CHATELET, P.; SYLVESTRE, I.; KONTIĆ, J.; ENGELMANN, F. Cryopreservation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) *in vitro* shoot tips. *Central European Journal of Biology*, Berlin, v. 8, p. 993-1000, 2013.
- MATHEW, L.; MCLACHLAN, A.; JIBRAN, R.; BURRITT, D. J.; PATHIRANA, R. Cold, antioxidant and osmotic pre-treatments maintain the structural integrity of meristematic cells and improve plant regeneration in cryopreserved kiwifruit shoot tips. *Protoplasma*, Berlin, v. 255, p. 1-13, 2018.
- MATSUMOTO, T. Cryopreservation of plant genetic resources: conventional and new methods. *Reviews in Agricultural Science*, Gifu, v. 5, p. 13-20, 2017.
- MATSUMOTO, T.; SAKAI, A. Cryopreservation of axillary shoot tips of *in vitro*-grown grape (*Vitis*) by a two-step vitrification protocol. *Euphytica*, Dordrecht, v. 131, p. 299-304, 2003.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, Oxford, v. 15, p. 473-497, 1962.
- NUNES, B. T. G.; REGO, J. I. S.; NASCIMENTO, J. H. B.; SOUZA, E. M. C.; SOUZA, A. R. E. Banco de gemoplasma de videira para o semiárido brasileiro. *In: SIMPÓSIO DA REDE DE RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS DO NORDESTE*, 2., 2015, Fortaleza. *Anais [...]* Fortaleza: Rede de Recursos Genéticos Vegetais do Nordeste, 2015. 89p.
- OIV – INTERNATIONAL ORGANISATION OF VINE AND WINE-INTERGOVERNMENTAL ORGANIZATION. *OIV Statistical Report on World Vitiviniculture*, 2018. Disponível em: <<http://www.oiv.int/public/medias/6371/oiv-statistical-report-on-world-vitiviniculture-2018.pdf>>. Acesso em: 3 dez. 2018.
- PATHIRANA, R.; MCLACHLAN, A.; HEDDERLEY, D.; CARRA, A.; CARIMI, F.; PANIS, B. Removal of leafroll viruses from infected grapevine plants by droplet vitrification. *Acta Horticulture*, Leuven, v. 1083, p. 491-498, 2015.
- PATHIRANA, R.; MCLACHLAN, A.; HEDDERLEY, D.; PANIS, B.; CARIMI, F. Pre-treatment with salicylic acid improves plant regeneration after cryopreservation of grapevine (*Vitis* spp.) by droplet vitrification. *Acta Physiologiae Plantarum*, Warszawa, v. 38, n. 1, p. 1-11, 2016.
- PLESSIS, P. C.; LEDDET, C.; DEREUDDRE, J. Resistance to dehydration and to freezing in liquid nitrogen of alginate coated shoot tips of grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay). *Comptes Rendus de l'Academie de Sciences*, Amsterdam, v. 313, n. 8, p. 373-380, 1991.
- PLESSIS, P. C.; LEDDET, C.; COLLAS, A.; DEREUDDRE, J. Cryopreservation of *Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay shoot tips by encapsulation-dehydration: effects of pre-treatment, cooling and post culture conditions. *CryoLetters*, Lewes, v. 14, p. 309-320, 1993.
- REED, B. M. Plant cryopreservation: a continuing requirement for food and ecosystem security. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, Plant, New York, v. 53, p. 285-288, 2017.
- SAKAI, A.; KOBAYASHI, S.; OIYAMA, I. Survival by vitrification of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Obs. Var. *Brasiliensis tanaka*). *Plant Cell Reports*, Wiesbaden, v. 9, p. 30-33, 1990.
- SAKAI, A.; MATSUMOTO, T.; HIRAI, D.; NIINO, T. Newly developed encapsulation-dehydration protocol for plant cryopreservation. *CryoLetters*, Lewes, v. 21, p. 53-62, 2000.
- SMITH, B. P.; MORALES, N. B.; THOMAS, M. R.; SMITH, H. M.; CLINGELEFFER, P. R. Grapevine rootstocks resistant to the root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, Hoboken, v. 23, n. 1, p. 125-131, 2016.
- VOLK, G. M.; SHEPHERD, A. N.; BONNART, R. Successful cryopreservation of *Vitis* shoot tips: novel pretreatment combinations applied to nine species. *CryoLetters*, Lewes, v. 39, p. 322-330, 2018.
- VOLK, G. M.; HENK, A. D.; JENDEREK, M. M.; RICHARDS, C. M. Probabilistic viability calculations for cryopreserving vegetatively propagated collections in genebanks. *Genetic Resources and Crop Evolution*, Norwell, v. 64, n. 7, p. 1613-1622, 2016.
- WANG, B.; WANG, R. R.; CUI, Z. H.; BI, W. L.; LI, J. W.; LI, B. Q.; OZUDOGRU, E. A.; VOLK, G. M.; WANG, Q. C. Potential applications of cryogenic technologies to plant genetic improvement and pathogen eradication. *Bio-technology Advances*, Amsterdam, v. 32, p. 583-595, 2014.
- WANG, Q.; LI, P.; BATUMAN, O.; GAFNY, R.; MAWASSI, M. Effect of benzyladenine on recovery of cryopreserved shoot tips of grapevine and citrus cultured *in vitro*. *CryoLetters*, Lewes, v. 24, p. 293-302, 2003a.
- WANG, Q. C.; MAWASSI, M.; LI, P.; GAFNY, R.; SELA, I.; TANNE, E. Elimination of grapevine virus A (GVA) by cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of *Vitis vinifera* L. *Plant Science*, Amsterdam, v. 165, n. 2, p. 321-327, 2003b.
- WANG, Q. C.; TANNE, E.; ARAV, A.; GAFNY, R. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of grapevine by encapsulation-dehydration. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v. 63, n. 1, p. 41-46, 2000. ■