

Criopreservação de sementes de espécies brasileiras do gênero *Dyckia* (Bromeliaceae)

Jean Carlo Baudraz de Paula* , Walter Aparecido Ribeiro Júnior ,
Gabriel Danilo Shimizu  & Ricardo Tadeu de Faria 

Universidade Estadual de Londrina (UEL), Departamento de Agronomia, rodovia Celso Garcia Cid, km 380,
Caixa Postal 10.011, CEP 86057-970, Londrina, Paraná, Brasil.

*Autor para correspondência: jc_baudraz@live.com

Recebido em 14.X.2020

Aceito em 24.X.2022

DOI 10.21826/2446-82312022v77e2022025

RESUMO – Objetivou-se avaliar diferentes crioprotetores na criopreservação em nitrogênio líquido (NL) de sementes das bromélias *Dyckia dusenii*, *Dyckia kranziana* e *Dyckia walteriana* e quantificar o teor de lipídios das sementes. Os tratamentos foram: controle, imersão em NL, glicerol 1 mol.L⁻¹, sacarose 0,4 mol.L⁻¹, PVS1, PVS2, PVS2 + 1 % floroglucinol e PVS3. Das sementes foi avaliado o teor total de lipídios. Avaliaram-se o percentual de germinação e plântulas anormais, índice de velocidade de germinação, comprimento e massa seca das plântulas. Após 150 dias, o comprimento e massa seca da parte aérea e radicular. Os crioprotetores não foram eficazes nas sementes de *D. dusenii* e *D. kranziana*, no entanto, para as de *D. walteriana* é recomendado o uso dos crioprotetores glicerol 1 mol.L⁻¹, sacarose 0,4 mol.L⁻¹, PVS1, PVS2, PVS2 + 1 % floroglucinol ou PVS3. Estudos da composição dos ácidos graxos saturados e insaturados são necessários para estabelecer uma relação com a criopreservação.

Palavras-chave: banco de germoplasma, *Dyckia dusenii*, *Dyckia kranziana*, *Dyckia walteriana*, nitrogênio líquido.

ABSTRACT – Cryopreservation of seeds of Brazilian species of the genus *Dyckia* (Bromeliaceae). The objective of this study was to evaluate different cryoprotectants in cryopreservation in liquid nitrogen (NL) of seeds of *Dyckia dusenii*, *Dyckia kranziana* and *Dyckia walteriana* and to quantify the lipid content of the seeds. The treatments were: control, immersion in NL, glycerol 1 mol.L⁻¹, sucrose 0.4 mol.L⁻¹, PVS1, PVS2, PVS2 + 1% floroglucinol and PVS3. From the seeds, the total lipid content was evaluated. The percentage of germination and abnormal seedlings, germination speed index, length and dry mass of the seedlings were evaluated. After 150 days, the length and dry mass of the aerial and root parts. The cryoprotectants were not effective in the seeds of *D. dusenii* and *D. kranziana*, however, for those of *D. walteriana* it is recommended to use the cryoprotectants glycerol 1 mol.L⁻¹, sucrose 0.4 mol.L⁻¹, PVS1, PVS2, PVS2 + 1 % floroglucinol or PVS3. Studies of the composition of saturated and unsaturated fatty acids are necessary to establish a relationship with cryopreservation.

Keywords: germplasm bank, *Dyckia dusenii*, *Dyckia kranziana*, *Dyckia walteriana*, liquid nitrogen.

INTRODUÇÃO

As bromélias são agrupadas em 52 gêneros e 3.320 espécies com ocorrência predominante no continente americano, exceto por uma espécie encontrada na África (Givnish *et al.* 2011, The Plant List 2022). O Brasil é um dos principais centros de diversidade genética das bromélias, onde estão distribuídas em 1.386 espécies, com destaque para o gênero *Dyckia*, com 130 espécies, sendo mais de 90% endêmicas (Büneker *et al.* 2022, Forzza *et al.* 2022).

As bromélias possuem interesse no setor econômico, ornamental e farmacêutico. No entanto, a maior importância dessas plantas deve-se ao fato de serem conhecidas como agregadoras da biodiversidade, já que em suas cisternas ou tanques, o acúmulo de água serve de alimento, reprodução

e refúgio contra predadores, além de seu interesse para agentes polinizadores, como por exemplo, os beija-flores (Schuttz *et al.* 2012).

Entretanto, com as mudanças no habitat causadas pelo desmatamento, queimadas e a intensificação do extrativismo, aumentou o número de espécies vulneráveis ou ameaçadas de extinção. De acordo com a Lista Nacional Oficial de Espécies da Flora Ameaçadas de Extinção, o Brasil tem o registro de 201 espécies de bromélias em risco de extinção, sendo fundamental procurar alternativas para a preservação das mesmas (Brasil 2014).

Entre as formas de preservação dessas espécies, a criopreservação é apresentada como alternativa viável e de baixo custo, cujo princípio está na preservação do material biológico em temperaturas extremamente baixas, de até

-196 °C. Esse método possibilita a redução do metabolismo do material de tal forma que após o descongelamento as atividades metabólicas sejam retomadas (Pegg 2007).

Dentre os tecidos vegetais, as sementes são as mais utilizadas na criopreservação, e para sua proteção contra o congelamento das estruturas celulares e possíveis danos causados pela desidratação são utilizadas substâncias crioprotetoras que irão agir nas células durante o período de armazenamento (Han *et al.* 2009).

Os crioprotetores podem ser classificados em dois grupos: os extracelulares, que possuem seu mecanismo de ação fora da célula, com destaque para os açúcares, tais como a trealose e a glicose, e os crioprotetores intracelulares, que irão agir no interior da célula, como, o glicerol, o dimetilsulfóxido e o etileno glicol (Gonçalves *et al.* 2008). Contudo, alguns crioprotetores como o glicerol e dimetilsulfóxido podem ser tóxicos para as sementes e, para minimizar os possíveis danos, é essencial conhecer o mecanismo de ação e os efeitos nocivos que essas substâncias possam causar ao material biológico a ser congelado (Silveira 2015).

Sabe-se que em sementes ortodoxas, como é o caso da maioria das sementes de *Dyckia*, a tolerância ao estresse causado por baixas temperaturas depende principalmente da capacidade de suas membranas em prevenir injúrias e manter sua integridade (Zhang *et al.* 2013). As sementes possuem mecanismos de proteção capazes de manter os sistemas de membranas das células em casos de estresse pelo frio. Tem-se o conhecimento de que a manutenção da fluidez da membrana está diretamente relacionada à composição lipídica, estudos indicam que, quanto maior a quantidade de lipídios, principalmente a quantidade de ácidos graxos insaturados em relação aos saturados, maior será sua proteção (Upchurch 2008).

Diante do importante papel ecológico e da ameaça de extinção das espécies de bromélias, associado à falta de estudos para sua preservação, este trabalho teve como objetivo avaliar diferentes soluções crioprotetoras na criopreservação em nitrogênio líquido de sementes das bromélias brasileiras *Dyckia dusenii* L.B. Sm., *Dyckia kranziana* Leme e *Dyckia walteriana* Leme e determinar o teor de lipídios das sementes estudadas.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Análise de Sementes da Universidade Estadual de Londrina, estado do Paraná, Brasil. Sementes de *Dyckia dusenii*, *D. kranziana* e *D. walteriana* foram coletadas de plantas matrizes na propriedade de um colecionador, localizada no município de Londrina, em dezembro de 2018, a partir de cápsulas maduras aproximadamente 60 dias após o florescimento. Após a coleta, as sementes ficaram mantidas a 10 ± 2 °C em geladeira durante uma semana, até a instalação do experimento.

Para a caracterização do lote, após a coleta das sementes, foi determinado o teor de água e a viabilidade das sementes

pelo teste de tetrazólio, ambos seguindo as especificações das Regras para Análise de Sementes (RAS) (Brasil 2009). Também foi quantificado, para cada espécie, o teor total de lipídios das sementes (Instituto Adolfo Lutz 2008).

Para obtenção do teor de água, foram alocadas quatro repetições de 0,2 g de sementes de cada espécie em estufa a 105 ± 3 °C durante 24 horas, e o resultado final obtido através da pesagem inicial e final das sementes, obtendo da diferença o teor de água. No teste de tetrazólio foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes cada. Para cada espécie, as sementes foram alocadas em criotubos com capacidade volumétrica de 2 mL e adicionada água destilada sendo mantidas por 24 horas a 25 °C em câmara de germinação. Em seguida, a água foi retirada e adicionada solução de sal de tetrazólio a 1 %, e as sementes mantidas em *Biochemical Oxygen Demand* (BOD) na ausência de luz, por 24 horas, a 30 °C. Após este período, foi avaliada a porcentagem de sementes viáveis com o auxílio de lupa. Não foram consideradas na contagem as sementes que não apresentavam embrião.

Os lipídios totais foram determinados através do método de Soxhlet. Foram pesadas 5 g de semente para cada espécie, com três repetições. As amostras foram alocadas em cartucho de extração e inseridas no aparelho extrator tipo Soxhlet, acoplado a um becker onde foi adicionado éter de petróleo (100%) (50 mL) e mantidas sob aquecimento em chapa elétrica à extração contínua por 4 horas, com reposição de éter quando necessário. Posteriormente, o becker contendo resíduo no fundo e o sobrenadante de éter foram deixados em fluxo até a evaporação total do éter. O becker contendo o resíduo extraído foi levado em estufa a 105 ± 3 °C por uma hora e em seguida resfriado em dessecador a temperatura ambiente (25 °C). O mesmo foi pesado e o teor de lipídios foi obtido pela equação 1, expresso em porcentagem.

Equação 1

$$\text{Lipídios (\%)} = \frac{(\text{Massa Becker Final} + \text{Gordura}) - \text{Massa do Becker} \times 100}{\text{Massa Amostra Úmida}}$$

Para a montagem dos tratamentos, as sementes foram alocadas em criotubos com capacidade volumétrica de 2 mL. Foram utilizados quatro criotubos com 50 sementes por tratamento para cada espécie avaliada. Os tratamentos consistiram em: controle (ausência de solução crioprotetora e sem imersão em nitrogênio líquido); sem crioprotetor (imersão em nitrogênio líquido sem adição de crioprotetor); glicerol 1 mol.L⁻¹; sacarose 0,4 mol.L⁻¹; PVS1; PVS2; PVS2 + 1 % floroglucinol e PVS3.

As soluções de vitrificação de plantas (PVS) consistiram de variadas composições. A solução de PVS1 foi composta por 19 % de glicerol (v/v), 13 % de etileno glicol (v/v), 6 % de dimetilsulfóxido (v/v) e sorbitol 0,5 mol.L⁻¹, diluído em meio MS (Murashige & Skoog 1962) modificado com a metade da concentração de macronutrientes (Sakai *et al.*

1990). A solução de PVS2 continha 30 % de glicerol (v/v), 15 % de etileno glicol (v/v), 15 % de dimetilsulfóxido (v/v) e sacarose 0,4 mol.L⁻¹, diluído em meio MS com metade da concentração de macronutrientes (Vendrame & Faria 2011) e a solução PVS3 foi composta por 50 % glicerol (v/v) e 50 % sacarose (v/v) diluído em água destilada (Teixeira *et al.* 2014). Todas as soluções foram preparadas em volume de 100 mL.

No tratamento controle, as sementes foram armazenadas dentro de criotubos a 10 ± 2 °C, até serem alocadas em câmara de germinação. No tratamento sem proteção, as sementes permaneceram imersas em nitrogênio líquido sem adição de substância crioprotetora. Os demais tratamentos foram constituídos da adição de 2 mL das diferentes soluções crioprotetoras nos criotubos.

Os tratamentos com glicerol 1 mol.L⁻¹ e sacarose 0,4 mol.L⁻¹ permaneceram expostos às soluções por 20 minutos à temperatura ambiente (25 ± 2 °C) e, na sequência, imersos em nitrogênio líquido. Nos tratamentos contendo PVS1, PVS2, PVS2 + 1 % floroglucinol e PVS3 as sementes com as soluções ficaram por 10 minutos em banho de gelo (0 °C) e, em seguida, foram imersas em nitrogênio líquido. Os criotubos permaneceram armazenados durante 15 dias.

Após a retirada das sementes, foi realizado o descongelamento rápido em aparelho banho-maria da marca Evlab®, modelo EV: 015 com precisão de 0,1 °C, à temperatura de 40 °C durante 1,5 minutos. As soluções crioprotetoras foram removidas dos criotubos com o auxílio de uma pipeta de Pasteur. Em seguida, as sementes foram lavadas três vezes, com água destilada autoclavada, desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio 1 % (1 minuto) seguida da imersão em álcool 70 % (1 minuto) e submetidas ao teste de germinação.

O teste de germinação foi conduzido sobre papel toalha germitest® umedecido com água destilada na proporção de 2,5 vezes a massa do substrato seco, e as sementes acondicionadas em caixas de poliestireno cristal (Gerbox®) de dimensões 11 cm × 11 cm × 3 cm. Foram utilizadas 50 sementes por caixa e quatro repetições por tratamento, mantidas em BOD à temperatura de 25 ± 2 °C, sob luz constante, seguindo os critérios estabelecidos nas RAS (Brasil 2009) para outras espécies de sementes pequenas, a fim de determinar o número de sementes germinadas.

Para as três espécies, foram realizadas a primeira e última contagem de germinação, estabelecendo um dia para a primeira e última contagem, visto que não há para estas espécies padronização para o teste de germinação. Para *D. dusenii* e *D. walteriana* a primeira contagem foi realizada ao 3° dia e o teste finalizado ao 10° dia, já *D. kranziana* teve sua contagem iniciada no 5° dia e finalizada ao 12° dia, considerando a porcentagem de plântulas normais (Brasil 2009), cuja plântula tenha a proporção de 1:2 (uma parte aérea para duas partes de raiz).

Foi realizada a contagem do número de sementes germinadas, para estabelecer o índice de velocidade de germinação (IVG), obtido através da equação 2 descrita por Maguire (1962):

Equação 2

$$IVG = G1/N1 + G2/N2 + \dots + Gn/Nn$$

em que: G1, G2 e Gn = número de plântulas normais, computadas na primeira, segunda e última contagem, respectivamente;

N1, N2, Nn = número de dias de semeadura da primeira, segunda e última contagem, respectivamente.

Foram selecionadas aleatoriamente e mensurado o comprimento de 20 plântulas, com o auxílio de paquímetro, expresso em milímetro (mm). Posteriormente, os materiais foram acondicionados em sacos de papel, secos em estufa com circulação forçada de ar a 65 °C, até atingirem massa constante, e pesados em balança de precisão de 0,0001 g a fim de determinar a massa seca de plântulas, expresso em miligramas (mg).

Ao final do teste de germinação, as plântulas permaneceram em BOD (25 ± 2 °C) por 30 dias. Posteriormente, foram selecionadas aleatoriamente 10 plântulas por tratamento e transplantadas para bandejas de polipropileno utilizando Carolina Soil® como substrato. As plantas foram mantidas em casa de vegetação climatizada, modelo Van der Hoeven® coberta com placas de policarbonato transparente e difusor, com retenção luminosa de 50 %, através de tela de sombreamento Aluminet® e temperatura controlada de 28 ± 3 °C. A irrigação manual foi realizada diariamente conforme a necessidade hídrica das plantas.

Após 150 dias em casa de vegetação, foram avaliados o comprimento (cm) da raiz e da parte aérea das plantas com o auxílio de paquímetro e a massa seca da raiz e parte aérea (mg), colocando as mesmas em sacos de papel e mantidas em estufa com circulação forçada de ar a 65 °C, até atingirem massa constante (cinco dias).

O delineamento foi inteiramente casualizado, com quatro repetições de 50 sementes por tratamento na fase de germinação, e 10 repetições por tratamento na fase em casa de vegetação. Os pressupostos de normalidade e homogeneidade de variâncias foram testados por Shapiro-Wilk e Bartlett ($p < 0,05$) respectivamente. Posteriormente, submetidos à análise de variância ($p < 0,05$) e comparados entre si pelo teste de Tukey à 5 % de significância. Os dados foram processados utilizando o software R (R Core Team 2019).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Sementes de *D. dusenii*, *D. kranziana* e *D. walteriana* apresentavam, respectivamente, 6,7, 7,2 e 8,7 % de teor de água e 85, 78 e 76 % de viabilidade antes do processo de criopreservação.

O teor inicial de água é fundamental para a criopreservação e garantir a sobrevivência das sementes após serem retiradas do nitrogênio líquido (Stegani *et al.* 2017). Recomenda-se que o mesmo esteja abaixo de 10 %

antes de congelar o material (Silva *et al.* 2011), valor este atendido neste estudo. Entretanto, o intervalo de água ideal para o congelamento difere entre as espécies. Pereira *et al.* (2010) em estudo com a bromélia *Pitcairnia albiflos* Herb., mantiveram a viabilidade das sementes submetidas a criopreservação (-196 °C) por um ano com 5-7 % de teor de água, mas observaram que a redução do teor para 3 % prejudicou a longevidade das mesmas.

Dentre os materiais utilizados (meristemas, suspensões celulares, embriões) as sementes de algumas espécies possuem vantagens em relação à sobrevivência e regeneração quando criopreservadas, uma vez que o tamanho reduzido favorece a desidratação, sendo este processo não prejudicial para sementes ortodoxas, assim o congelamento ocorre de forma mais rápida e uniforme, além de ser material jovem, que apresenta células pequenas e citoplasma denso com poucos vacúolos, o que significa menos água livre e disponível para o congelamento (Carvalho & Vidal 2003).

A porcentagem de germinação após a criopreservação variou de 61 a 78 % para *D. dusenii* e 62 a 73 % para *D. kranziana*, sem diferença entre os tratamentos (Tab. 1). Segundo Nikishina *et al.* (2007) as taxas de germinação de sementes após sua exposição ao nitrogênio líquido variam conforme a espécie, e podem ser menores ou maiores do que no controle, sendo esta diferença dependente da eficiência dos crioprotetores, em função da estrutura (célula ou tecido), concentração e tempo de exposição antes do processo de criopreservação.

Ao comparar os tratamentos, houve comportamento similar para as espécies *D. dusenii* e *D. kranziana*, por outro lado, *D. walteriana* apresentou comportamento diferente.

Para todas as variáveis avaliadas, as espécies *D. dusenii* e *D. kranziana*, não apresentaram diferença entre os tratamentos utilizados, podendo esses materiais serem criopreservados sem proteção (Tab. 1). Deste modo, foi possível observar plântulas com desenvolvimento normal após o congelamento (Fig. 1).

Tabela 1. Porcentagem de germinação (GERM), plântulas anormais (PA), índice de velocidade de germinação (IVG), comprimento (CP) e massa seca de plântulas (MSP) de *D. dusenii* e *D. kranziana* submetidas ao processo de criopreservação (-196°C).

<i>D. dusenii</i>					
Tratamentos	GERM (%)	PA (%)	IVG	CP (mm)	MSP (mg)
Controle*	78,0	3,0	4,53	7,22	4,53
Sem crioprotetor	69,0	3,0	3,55	6,73	3,56
Glicerol 1 mol.L ⁻¹	56,0	2,0	3,13	6,61	3,14
Sacarose 0,4 mol.L ⁻¹	74,0	2,0	4,02	6,97	4,02
PVS1**	68,0	3,0	3,72	6,63	4,01
PVS2**	66,0	2,0	3,42	6,74	3,42
PVS2 + 1% F**	66,0	3,0	3,72	6,17	3,73
PVS3**	61,0	2,0	3,15	6,62	3,15
Coefficiente de Variação (%)	14,7	61,0	16,5	7,3	5,6
<i>D. kranziana</i>					
Tratamentos	GERM (%)	PA(%)	IVG	CP (mm)	MSP (mg)
Controle*	73,0	3,0	3,54	7,80	4,23
Sem crioprotetor	68,0	2,0	3,53	7,01	3,87
Glicerol 1 mol.L ⁻¹	63,0	3,0	3,04	7,62	3,78
Sacarose 0,4 mol.L ⁻¹	71,0	2,0	3,54	7,32	3,85
PVS1**	65,0	3,0	3,36	7,05	3,67
PVS2**	64,0	2,0	3,29	7,36	3,89
PVS2 + 1% F**	70,0	3,0	3,58	7,70	4,12
PVS3**	62,0	4,0	3,17	7,33	3,94
Coefficiente de Variação (%)	14,7	70,1	16,4	7,9	10,6

* Tratamento sem passar pelo processo de criopreservação e mantidas a 10 ± 2 °C em geladeira.

**PVS1 [19 % de glicerol (v/v), 13 % de etileno glicol (v/v), 6 % de dimetilsulfóxido (v/v) e sorbitol 0,5 mol.L⁻¹, diluído em ½ meio MS (Murashige & Skoog 1962)] PVS2 [30 % de glicerol (v/v), 15 % de etileno glicol (v/v), 15 % de dimetilsulfóxido (v/v) e sacarose 0,4 mol.L⁻¹, diluído em ½ meio MS]; PVS2 + 1 % floroglucinol e PVS3[50 % glicerol (v/v) e 50 % sacarose (v/v) diluído em água destilada].

O fato das sementes destas espécies manterem sua qualidade fisiológica quando em nitrogênio líquido ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) é explicado por Stanwood e Ross (1979). De acordo com esses autores, sementes ortodoxas, podem ser desidratadas a um baixo grau de umidade (5-7 %) sem a ocorrência de danos por congelamento ou por formação de cristais de gelo. Assim, o baixo teor de água livre presente nas sementes foi fundamental para evitar a ruptura do sistema de endomembranas e resultar na perda da semipermeabilidade e da compartimentalização celular (Kaviani *et al.* 2009).

Tarré *et al.* (2007) relataram que não houve efeito negativo na porcentagem de germinação das sementes de *Encholirium pedicellatum* Rauh., *Encholirium magalhaesii* L.B. Smith., *Encholirium reflexum* Forzza & Wand., *Encholirium subsecundum* Baker Mez., *Dyckia sordida* Baker e *Dyckia ursina* L.B. Smith. com teor de água entre 2,5 e 4,2 %. Já para as sementes de *Encholirium heloisae* L.B. Smith. e *Encholirium scrutator* L.B. Smith Rauh. a

dessecação foi prejudicial para a germinação. Entretanto, os mesmos autores ao armazenarem durante um ano em nitrogênio líquido ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) as sementes das oito espécies citadas acima, com teor de água variando de 11 a 28 % não verificaram efeito negativo na germinação, exceto para *E. pedicellatum*.

Espécies de bromélias endêmicas da Mata Atlântica *Alcantarea imperialis* Carrière Harms, *Nidularium ferdinando-coburgii* Wawra, *Pitcairnia albiflos* Herb., *Pitcairnia encholirioides* L.B. Sm., *Pitcairnia flammea* Lindl., *Vriesea cacuminis* L.B. Smith., *Vriesea friburgensis* Mez e *Wittrockia gigantea* (Baker) Leme tiveram sementes preservadas com baixo teor de água (5-7 %) após o congelamento em nitrogênio líquido, mantendo a viabilidade por um ano sem a presença de substâncias crioprotetoras (Rodrigues *et al.* 2014).

Para as sementes de *D. walteriana*, a resposta ao processo de criopreservação diferiu em comparação com as espécies *D. dusenii* e *D. kranziana* (Tab. 2).

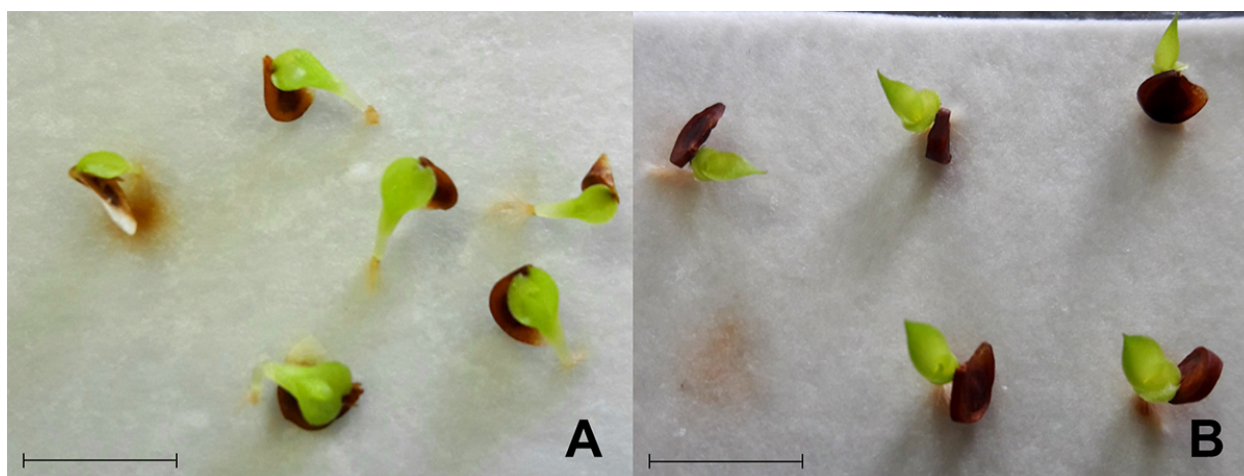


Figura 1. Plântulas após 15 dias de cultivo em câmara de germinação. **A.** *Dyckia dusenii*; **B.** *D. kranziana*. Barra = 1cm.

Tabela 2. Porcentagem de germinação (GERM), plântulas anormais (PA), índice de velocidade de germinação (IVG), comprimento (CP) e massa seca de plântulas (MSP) de *D. walteriana* submetidas ao processo de criopreservação ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Tratamentos	GERM (%)	PA (%)	IVG	CP (mm)	MSP (mg)
Controle*	72,0 a**	1,0 a	4,02 a	7,60 a	4,02 a
Sem crioprotetor	41,0 b	4,0 a	1,99 c	6,54 b	1,99 c
Glicerol 1 mol.L ⁻¹	62,0 a	4,0 a	2,84 ab	7,00 ab	2,85 b
Sacarose 0,4 mol.L ⁻¹	64,0 a	1,0 a	3,22 ab	7,05 ab	3,22 ab
PVS1***	64,0 a	2,0 a	3,66 ab	6,68 ab	3,66 ab
PVS2***	68,0 a	2,0 a	3,68 ab	7,24 ab	3,68 ab
PVS2 + 1% F***	69,0 a	3,0 a	3,97 a	7,19 ab	3,97 a
PVS3***	65,0 a	3,0 a	2,93 ab	7,18 ab	2,33 bc
Coefficiente de Variação (%)	14,8	60,5	21,7	8,7	5,4

*Tratamento sem passar pelo processo de criopreservação e mantidas a $10 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ em geladeira.

**Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

***PVS1 [19 % de glicerol (v/v), 13 % de etileno glicol (v/v), 6 % de dimetilsulfóxido (v/v) e sorbitol 0,5 mol.L⁻¹, diluído em ½ meio MS (Murashige & Skoog 1962)]; PVS2 [30 % de glicerol (v/v), 15 % de etileno glicol (v/v), 15 % de dimetilsulfóxido (v/v) e sacarose 0,4 mol.L⁻¹, diluído em ½ meio MS]; PVS2 + 1 % floroglucinol e PVS3[50 % glicerol (v/v) e 50 % sacarose (v/v) diluído em água destilada].

O tratamento desprovido de crioprotetor afetou negativamente a germinação (41 %) e o IVG (1,99) de *D. walteriana*, diferindo dos demais tratamentos. Entre os crioprotetores utilizados não houve diferença na germinação, com variação de 62% para o tratamento com glicerol 1 mol.L⁻¹ a 69 % para o tratamento com PVS2 + 1 % F (Tab. 2). Na variável porcentagem de PA e o CP não houve diferença entre os tratamentos, com variação de 1 a 4 % para PA e 6,54 a 7,24 mm para CP. Para MSP, o tratamento sem proteção apresentou o menor valor (1,99 g) não diferindo apenas de PVS3 (2,33 g).

Neste estudo, observou-se que a utilização de crioprotetores foi eficiente para a manutenção da viabilidade e do potencial germinativo, pois as ligações de hidrogênio entre os crioprotetores e a molécula de água diminuem a formação de cristais de gelo, além de promoverem a estabilização da estrutura quaternária das proteínas de membrana, preservando-as da desidratação (Sakai 1995). No entanto, verificou-se que a ausência de proteção das sementes foi prejudicial para *D. walteriana* (Fig. 2). Veiga *et al.* (2006) ressaltaram que alguns tecidos vegetais não são capazes de sobreviver em baixas temperaturas (-196 °C) sem a proteção proporcionada por tratamentos químicos especiais.

Além disso, as sementes, principalmente as ortodoxas, possuem mecanismos de proteção capazes de manter os sistemas de membranas das células, as estruturas das macromoléculas e as substâncias de reserva em condições de restabelecer suas funções fisiológicas após um período de desidratação e congelamento (Walters *et al.* 2001).

A espécie *D. walteriana*, que apresentou o menor teor de lipídios totais dentre as espécies estudadas, apresentando teor de 0,1 %. Por outro lado, a espécie *D. dusenii*, apresentou 2,1 % e *D. kranziana*, com 0,5 % (Fig. 3).

Embora o estudo em questão não tenha correlacionado o teor de lipídios com a sobrevivência, verifica-se que as espécies *D. dusenii* e *D. kranziana* apresentaram resistência ao congelamento em nitrogênio líquido sem crioprotetor, entretanto, para *D. walteriana* verificou-se o oposto. O

baixo teor de lipídios para esta espécie pode ser uma das explicações da redução da germinação no tratamento sem proteção das sementes.

Vale lembrar que as propriedades físicas dos lipídios são determinadas pelos ácidos graxos. Quanto maior o comprimento da cadeia carbônica, maior o ponto de fusão e quanto maior o grau de insaturação, menor o ponto de fusão (Voelker & Kinney 2001), por isso, somente a quantidade total de lipídios não dá garantia do sucesso da sobrevivência das sementes armazenadas em baixa temperatura. Graiver *et al.* (2011) observaram a relação entre o conteúdo lipídico das sementes de *Citrus* L. e o teor de água descongelada, e verificaram correlação positiva entre as porcentagens de ácidos graxos insaturados e de recuperação de plântulas após resfriamento rápido ou lento.

Além da relação do teor de lipídios com a capacidade de armazenamento à baixa temperatura, os carboidratos solúveis como a sacarose, desempenham importante papel na redução da deterioração, atuando na proteção da estrutura celular e funcionamento de fosfolipídios, além de manter o estágio vítreo da semente. Também estão presentes as proteínas LEA, que inibem a desnaturação de macromoléculas e conservam a estabilidade das estruturas intracelulares sob condições de desidratação (Berjak & Pammenter 2013, Marcos Filho 2015).

O acúmulo de reserva garante a manutenção da integridade das membranas, desdiferenciação celular e redução do metabolismo, além disso, a presença de um sistema antioxidante eficiente e a presença e operação de um sistema de reparo durante a reidratação.

Para garantir que as plântulas após o descongelamento tenham um desenvolvimento normal, estudos posteriores à germinação são essenciais. Os resultados indicaram que, após 150 dias de cultivo, para todas as espécies, não houve influência das substâncias crioprotetoras sobre o material e, também, não foi verificada alteração no desenvolvimento de raízes, parte aérea e massa seca entre os crioprotetores utilizados, não havendo diferença entre os tratamentos para as variáveis analisadas (Tab. 3).

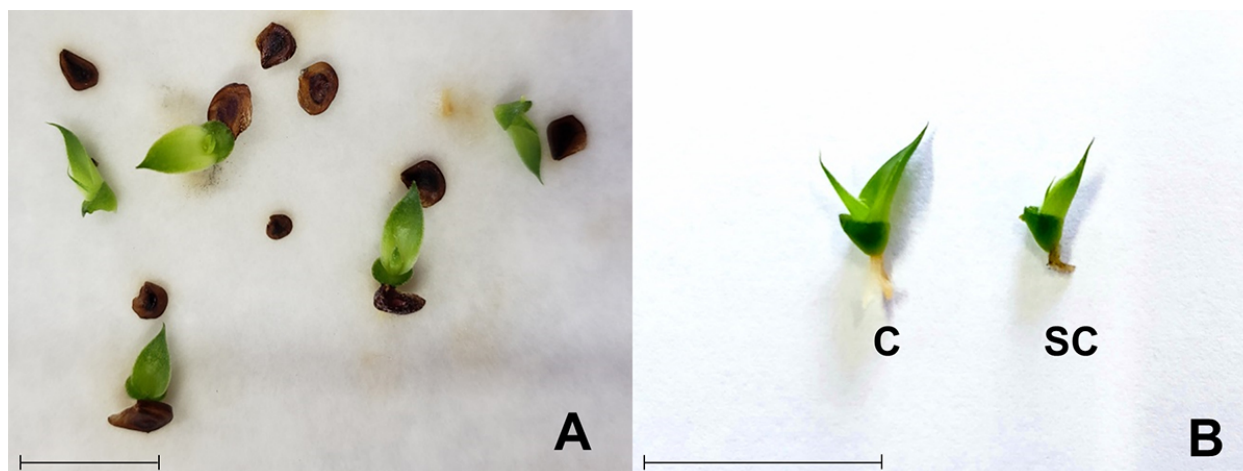


Figura 2. A. Plântulas de *Dyckia walteriana* após 15 dias de cultivo em câmara de germinação; B. Comparação das plântulas no tratamento controle (C) e sem crioprotetor (SC). Barra = 1cm.

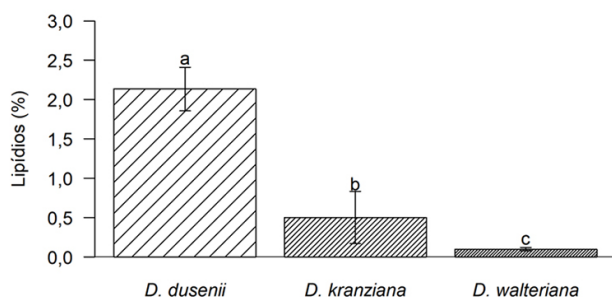


Figura 3. Teor de lipídios (%) em sementes de *Dyckia dusenii*, *D. kranziana* e *D. walteriana*. Letras iguais entre colunas não diferem pelo teste de Tukey a 5 % de significância.

Avaliações posteriores quanto ao uso de substâncias crioprotetoras são fundamentais, principalmente, porque algumas destas substâncias podem ser tóxicas ou causar estresse osmótico devido a sua elevada concentração, o que resulta em morte celular ou modificação da resposta morfogenética (Gonzalez-Arnan *et al.* 2008). No entanto, não se verificou efeito negativo da utilização destas substâncias sobre as espécies estudadas. A partir deste resultado torna-se viável a aplicação da técnica de criopreservação, sendo um método vantajoso e eficiente quando comparado aos tradicionais métodos de preservação (Vendrame *et al.* 2014).

Tabela 3. Comprimento da parte aérea (CPA) e raiz (CR), massa seca da parte aérea (MSPA) e raiz (MSR) de *D. dusenii*, *D. kranziana* e *D. walteriana* após 150 dias de cultivo em casa de vegetação.

<i>D. dusenii</i>				
Tratamentos	CPA (cm)	CR (cm)	MSPA (mg)	MSR (mg)
Controle*	1,53	1,97	9,52	13,16
Sem crioprotetor	1,37	1,88	9,13	12,43
Glicerol 1 mol.L ⁻¹	1,43	1,82	9,18	11,78
Sacarose 0,4 mol.L ⁻¹	1,41	1,96	9,28	12,32
PVS1**	1,45	1,92	9,12	11,91
PVS2**	1,49	1,87	9,27	11,96
PVS2 + 1% F**	1,48	1,91	9,31	13,39
PVS3**	1,45	1,83	9,22	11,74
Coeficiente de Variação (%)	8,9	12,1	17,6	17,3
<i>D. kranziana</i>				
Controle*	2,40	2,81	20,89	14,75
Sem crioprotetor	2,27	2,48	18,02	12,82
Glicerol 1 mol.L ⁻¹	2,33	2,78	18,75	14,27
Sacarose 0,4 mol.L ⁻¹	2,37	2,70	19,91	14,05
PVS1**	2,37	2,66	18,90	13,50
PVS2**	2,34	2,69	18,60	13,58
PVS2 + 1% F**	2,29	2,63	20,44	14,19
PVS3**	2,39	2,63	18,51	13,39
Coeficiente de Variação (%)	11,9	13,2	8,0	12,7
<i>D. walteriana</i>				
Controle*	2,40	2,81	20,89	14,75
Sem crioprotetor	2,27	2,48	18,02	12,82
Glicerol 1 mol.L ⁻¹	2,33	2,78	18,75	14,27
Sacarose 0,4 mol.L ⁻¹	2,37	2,70	19,91	14,05
PVS1**	2,37	2,66	18,90	13,50
PVS2**	2,34	2,69	18,60	13,58
PVS2 + 1% F**	2,29	2,63	20,44	14,19
PVS3**	2,39	2,63	18,51	13,39
Coeficiente de Variação (%)	8,4	13,2	8,1	9,3

*Tratamento sem passar pelo processo de criopreservação e mantidas a 10 ± 2 °C em geladeira.

**PVS1 [19 % de glicerol (v/v), 13 % de etileno glicol (v/v), 6 % de dimetilsulfóxido (v/v) e sorbitol 0,5 mol.L⁻¹, diluído em ½ meio MS (Murashige & Skoog 1962), PVS2 [30 % de glicerol (v/v), 15 % de etileno glicol (v/v), 15 % de dimetilsulfóxido (v/v) e sacarose 0,4 mol.L⁻¹, diluído em ½ meio MS]; PVS2 + 1 % floriglucinol e PVS3[50 % glicerol (v/v) e 50 % sacarose (v/v) diluído em água destilada].

Para todos os tratamentos, as plantas tiveram desenvolvimento satisfatório tanto da parte aérea como radicular (Fig. 4), entretanto, para *D. walteriana*, a germinação foi afetada quando não utilizado crioprotetor, tornando-se necessária para essa espécie a adição de crioprotetores.

CONCLUSÃO

Para as espécies *Dyckia dusenii* e *D. kranziana* não houve necessidade da utilização de soluções crioprotetoras nas sementes durante o processo de criopreservação em nitrogênio líquido. Para a espécie *D. walteriana* é recomendado o uso de crioprotetores, sendo recomendado glicerol 1 mol.L⁻¹, sacarose 0,4 mol.L⁻¹, PVS1, PVS2, PVS2 + 1 % floroglucinol ou PVS3.

Os teores de lipídios das sementes variaram entre as espécies, no entanto, estudos a respeito da relação de ácidos graxos insaturados e saturados são necessários para estabelecer uma relação efetiva com a criopreservação.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao pesquisador Walter Miguel Kranz pela doação das sementes e colaboração no desenvolvimento deste trabalho e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa cedida ao primeiro autor (nº 88882.448347/2019-01) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro ao terceiro autor (nº 141699/2020-5) e ao último autor (nº 301684/2017-0); e à Universidade Estadual de Londrina (UEL).

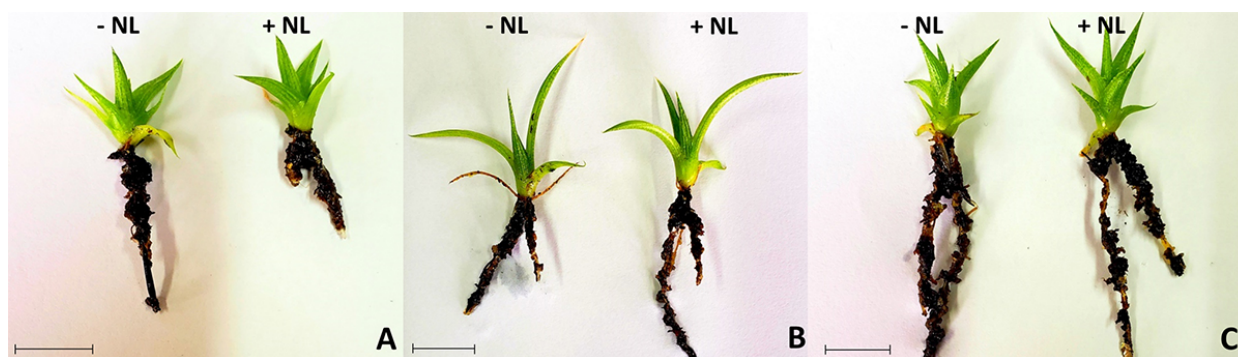


Figura 4. Desenvolvimento de plantas após 150 dias submetidos (+NL) ou não (-NL) a criopreservação em nitrogênio líquido. **A.** *Dyckia dusenii*; **B.** *D. kranziana*; **C.** *D. walteriana*. Barra = 1cm.

REFERÊNCIAS

- Bejak, P. & Pammenter, N. W. 2013. Implications of the lack of desiccation tolerance in recalcitrant seeds. *Frontiers in Plant Science* 4: 1-9.
- Brasil - Ministério do Meio Ambiente - MMA. 2014. Portaria n. 443, de 17 de dezembro de 2014. Lista Nacional Oficial de Espécies da Flora Ameaçadas de Extinção. Diário Oficial da União, 18/12/2014, 1, 110-121.
- Büneker, H. M., Guarçoni, E. A. E., Santos-Silva, F., Forzza, R. C. 2022. *Dyckia*. In *Flora do Brasil 2020*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <https://floradobrasil2020.jbrj.gov.br/FB6046>. Acessado em 19.08.2022.
- Brasil. 2009. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para análise de sementes. Mapa/ACS, Brasília. 399 p.
- Carvalho, J. M. F. C. & Vidal, M. S. 2003. Criopreservação no Melhoramento Vegetal. Embrapa, Campina Grande. 22 p.
- Forzza, R. C., Costa, A. F., Maciel, J. R., Kessous, I. M., Monteiro, R. F., Faria, A. P. G., Tardivo, R. C., Büneker, H. M., Saraiva, D. P., Moreira, B. A., Jacques, S. S. A., Almeida, M. M., Santos-Silva, F., Louzada, R. B., Moura, R. L., Couto, D. R., Neves, B., Oliveira, F. M. C., Araújo, C. C., Gonçalves-Oliveira, R. C., Versieux, L. M., Romanini, R. P., Machado, T. M., Silva, R. S. A., Paixão Souza, B., Gomes-da-Silva, J., Uribe, F. P., Guarçoni, E. A. E., Sousa, L. O. F., Pontes, R. A. S., Nogueira, M. G. C., Sousa, G. M., Koch, A. K., Picanço, W. L., Cardoso, P. H., Martins, S. E., Barbosa-Silva, R. G., Wanderley, M. G. L. 2022. Bromeliaceae. In *Flora do Brasil 2020*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <https://floradobrasil2020.jbrj.gov.br/FB6046>. Acessado em 19.08.2022.
- Givnish, T. J., Barfuss, M. H. J., Van, E. E. B., Riina, R., Schulte, K., Horres, R., Gonsiska, P. A., Jabaily, R. S., Crayn, D. M., Smith, A. C., Winter, K., Brown, G. K., Evans, T. M., Holst, B. K., Luther, H., Till, W., Zizka, G., Berry, P. E. & Sytsma, K. J. 2011. Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography in Bromeliaceae: insights from an eight-locus plastid phylogeny. *American Journal of Botany* 98: 1-24.
- Gonzalez-Arriaga, M. T., Panta, A., Roca, W. M., Escobar, R. H. & Engelmann, F. 2008. Development and large scale application of cryopreservation techniques for shoot and somatic embryo cultures of tropical crops. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 92: 1-13.
- Gonçalves, P. B. D., Figueiredo, J. R. & Freitas, V. J. F. 2008. Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal. Roca, São Paulo. 408 p.
- Graiver, N., Califano, A. & Zaritzky, N. 2011. Partial dehydration and cryopreservation of *Citrus* seeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 91: 2544-2550.
- Han, X., Mab, L., Benson, J., Brown, A. & Critser, J. K. 2009. Measurement of the apparent diffusivity of ethylene glycol in mouse ovaries through rapid MRI and theoretical investigation of cryoprotectant perfusion procedures. *Cryobiology* 58: 298-302.
- Instituto Adolfo Lutz. 2008. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. IAL, São Paulo. 1020 p.
- Kaviani, B., Safari-Motlagh, M. R., Padasht-Dehkaei, M. N., Darabi, A. H. & Rafizadeh, A. 2009. Cryopreservation of seeds of lily [*Lilium ledebourii* (Baker) Bioss]: use of sucrose and dehydration. *African Journal of Biotechnology* 8: 3809-3810.
- Maguire, J. D., 1962. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop science* 2: 176-177.

- Marcos Filho, J. 2015. Fisiologia de sementes de plantas cultivadas. FEALQ, Piracicaba. 660 p.
- Murashige, T. & Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 5: 473-497.
- Nikishina, T. V., Popova, A. E. V., Vakhrameeva, M. G., Varlygina, T. I., Kolomeitseva, G. L., Burov, A. V., Popovich, E. A., Shirokov, A. I., Shumilov, V. Y. U. & Popov, A. S. 2007. Cryopreservation of seeds and protocorms of rare temperate orchids. *Russian Journal of Plant Physiology* 54: 121-127.
- Pegg, D. E. 2007. Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols Methods. Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols. Humana Press Inc: 39-57.
- Pereira, A. R., Andrade, A. C. S., Pereira, T. S., Forzza, R. C. & Rodrigues, A. S. 2010. Morphological aspects of seed, germination and storage of *Pitcairnia albiflos* (Bromeliaceae). *Seed Science and Technology* 38: 79-87.
- R Core Team. R., 2019. A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. Disponível em: <http://www.r-project.org>. Acessado em 14.09.2020.
- Rodrigues, A. R. P., Forzza, R. C. & Andrade, A. C. S. 2014. Physiological characteristics underpinning successful cryopreservation of endemic and endangered species of Bromeliaceae from the Brazilian Atlantic Forest. *Botanical Journal of the Linnean Society* 176: 567-578.
- Sakai, A., Kobayashi, S. & Oiyama, I. 1990. Cryopreservation of nucellar cell of navel orange (*Citrus sinensis* Obs. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. *Plant Cell* 9: 30-33.
- Sakai, A. 1995. Cryopreservation of germplasm of woody plants. In *Biotechnology in agriculture and forestry* (Y. P. S. Bajaj, ed.). Springer Verlag, Berlin, Heierlberg, New York, p. 53-69.
- Schultz, R., Araújo, L. C. & Sá, F. S. 2012. Bromélias: abrigos terrestres de vida de água doce na floresta tropical. *Natureza on line* 10: 89-92.
- Stanwood, P. C. & Ross, E. E. 1979. Seed storage of several horticultural species in liquid nitrogen (-196 °C). *Horticultural Science* 14: 628-630.
- Silveira, A. A. C. 2015. Criopreservação de ápices caulinares e micropropagação em condições heterotróficas e mixotróficas de *Eugenia dysenterica* (Mart.). Dissertação 78 f., Universidade Federal de Goiás, Goiânia.
- Silva, R. C., Camillo, J., Luis, Z. G. & Scherwinski-Pereira, J. E. 2011. Potencial germinativo e morfoanatomia foliar de plântulas de pinhão-manso originadas de germoplasma criopreservado. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 46: 836-844.
- Stegani, V., Alves, G. A. C., Bertoni, D. J. & Faria, R. T. 2017. Criopreservação de sementes de rainha do abismo (*Sinningia leucotricha*). *Ornamental Horticulture* 23: 15-21.
- Tarré, E., Pires, B. B. M., Guimarães, A. P. M., Carneiro, L. A., Forzza, R. C. & Mansur, E. 2007. Germinability after desiccation, storage and cryopreservation of seeds from endemic *Encholirium* Mart. ex Schult. & Schult. f. and *Dyckia* Schult. & Schult. f. species (Bromeliaceae). *Acta Botanica Brasilica* 21: 777-783.
- Upchurch, R. G. 2008. Fatty acid unsaturation, mobilization, and regulation in the response of plants to stress. *Biotechnology Letters* 30: 967-977.
- Teixeira, A. S., Faltus, M., Zamecnik, J., Benito, G. M. E. & Garcia, M. A. D. 2014. Glass transition and heat capacity behaviors of plant vitrification solutions. *Thermochimica Acta* 593: 43-49.
- The Plant List. A working list of all plant species. Disponível em: <http://www.theplantlist.org/>. Acessado em 09.08.2022.
- Veiga, R. F. de A., Meletti, L. M. M., Barbosa, W. & Tombolato, A. F. C. 2006. A crioconservação de sementes de recursos genéticos hortícolas no Instituto Agronômico (IAC). *O Agrônomo* 58: 19-21.
- Vendrame, W. A. & Faria, R. T. 2011. Phloroglucinol enhances recovery and survival of cryopreserved *Dendrobium nobile* protocorms. *Scientia Horticulturae* 128: 131-135.
- Vendrame, W. A., Faria, R. T., Sorace, M. & Sahyun, S. A. 2014. Review - Orchid cryopreservation. *Ciência e Agrotecnologia* 38: 213-229.
- Voelker, T. & Kinney, A. J. 2001. Variations in the biosynthesis of seed-storage lipids. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52: 335-361.
- Walters, C., Pammenter, N. W., Berjak, P. & Crane, J. 2001. Desiccation damage, accelerated ageing and respiration in desiccation tolerant and sensitive seeds. *Seed Science Research* 11: 135-148.
- Zhang, J., Lui, H., Sun, J., Li, B., Zhu, Q., Chen, S. & Zhang, H. 2013. *Arabidopsis* fatty acid desaturase FAD2 is required for salt tolerance during seed germination and early seedling growth. *PLoS One* 7: e30355.