

Francisco Sebastian Montoya Serrano

**CRIOPRESERVAÇÃO DE SEMENTES DA BROMELIA *Vriesea reitzii* Leme & A. Costa: MORFO-HISTOQUÍMICA, ULTRAESTRUTURA E REGENERAÇÃO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências; área de concentração em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientador: Profa. Dra. Rosete Pescador

Coorientador: Prof. Dr. Lírío Luiz Dal Vesco

Florianópolis  
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor  
Através do Programa de Geração Automática da Biblioteca  
Universitária da UFSC.

Montoya-serrano, Francisco Sebastian  
CRIOPRESERVAÇÃO DE SEMENTES DA BROMELIA Vriesea  
reitzii Leme & A. Costa: MORFO-HISTOQUÍMICA,  
ULTRAESTRUTURA E REGENERAÇÃO / Francisco Sebastian  
Montoya-serrano ; orientadora, Rosete Pescador,  
coorientador, Lírio Luiz Dal Vesco, 2018.  
68 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias,  
Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos  
Vegetais, Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Recursos Genéticos Vegetais. 2. Bromeliaceae.  
3. Armazenamento de semente. 4. Nitrogênio líquido.  
5. Anatomia. I. Pescador, Rosete . II. Dal Vesco,  
Lírio Luiz. III. Universidade Federal de Santa  
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Recursos  
Genéticos Vegetais. IV. Título.

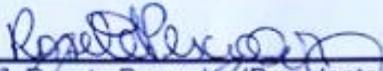
**Criopreservação de sementes da bromélia  
*Vriesea reitzii* Leme & A. Costa: morfo-  
histoquímica, ultraestrutura e regeneração**

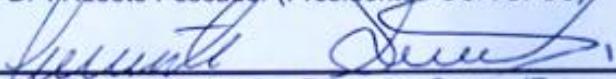
por

**Francisco Sebastian Montoya Serrano**

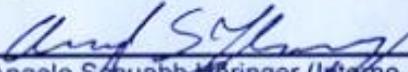
Dissertação julgada e aprovada em 27/02/2018, em sua forma final, pelo Orientador e membros da Banca Examinadora, para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de Concentração Recursos Genéticos Vegetais, no Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, CCA/UFSC.

Banca Examinadora:

  
\_\_\_\_\_  
Prof.ª Dr.ª Rosete Pescador (Presidente - CCA/UFSC)

  
\_\_\_\_\_  
Prof.ª Dr.ª Cristina Magalhães Ribas dos Santos (Externo - CCA/UFSC)

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Ramon Felipe Scherer (Externo - EPAGRI/Itajai)

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Angelo Schuabb Heringer (Interno - CCA/UFSC)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Paulo Emilio Lovato (Coordenador do Programa)

Florianópolis, fevereiro de 2018



Este trabalho é dedicado aos meus pais, e a minha companheira de vida, agradecimento total.



## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Catarina, e ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, pela formação acadêmica e por permitir a realização do mestrado.

À minha mãe Maria Teresa, pela confiança, amor e apoio incondicional e pela força.

À minha Namorada Cindy, pelo apoio, pelo amor e pela ajuda nos trabalhos e longas jornadas.

À professora Profa. Dra. Rosete Pescador pela orientação e pelos ensinamentos e confiança, e disponibilizar as ajudas para a realização do mesmo.

Ao professor Prof. Dr. Lírio Luiz Dal Vesco pela coorientação, pelo interesse em nosso trabalho, por todos os ensinamentos, dicas e sugestões e por disponibilizar o material vegetal para realização do trabalho

À CAPES pela bolsa de estudo de mestrado concedida que permitiu a elaboração do trabalho.

Agradeço aos meus colegas do laboratório, Julia, Nadhine, Elisandra, Bruna, Pricila, Luiza, William e Daniel pela ajuda, pela força e as dicas.

Ao Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal (LFDGV), pela disponibilidade de materiais e equipamentos.

Ao Laboratório de Microscopia Central, LCME, pelas análises da MET.



## RESUMO

A bromélia *Vriesea reitzii*, nativa da Mata Atlântica, é afetada pelo extrativismo crescente e em virtude da devastação antrópica da sua área biogeográfica, levando-a a estar na "categoria vulnerável" de plantas ameaçadas. Para reduzir este impacto, faz-se necessário estudos de desenvolvimento de protocolos para a conservação destes recursos genético. Desta forma, objetivou-se estabelecer um protocolo de criopreservação de sementes de *V. reitzii*, coletadas de frutos em três tempos de maturação, 120, 135 e 150 dias após antese. Foram determinados os conteúdos de água, porcentagem de germinação, índice de velocidade de germinação (IVG) e quantificados os carboidratos solúveis totais. Análises de microscopia óptica e eletrônica de transmissão (MET) foram realizadas em sementes criopreservadas, e não criopreservadas, como controle. A maior e significativa ( $p < 0,05$ ) porcentagem média de umidade (17,6%) presente foi observada em sementes coletadas aos 120 dias após a antese, seguidas das sementes coletadas aos 135 (14,6%) e 150 (14,4%) dias. Verificou-se, no entanto que, a maior e significativa ( $p < 0,01$ ) porcentagem média de germinação (89,6%) foi observada com sementes coletadas aos 150 dias após antese, independente de serem criopreservadas ou não. O maior e significativo ( $p < 0,05$ ) índice de velocidade de germinação médio (GRI) (17) foi observado em sementes coletadas aos 150 dias após a antese, diferenciando-se de 120 (13,6) e 135 (14,4) dias. A quantificação de carboidratos solúveis totais das sementes não revelou diferença significativa entre os diferentes períodos de coleta e com ou sem criopreservação. Através da análise morfo-histológica das sementes, após o processo ou não da criopreservação, não foram observados danos celulares e alterações estruturais. Além disto, independente das sementes terem passado pelo processo criogênico observou-se a germinação e o desenvolvimento das plântulas. A partir destes resultados, pode-se inferir que as sementes de *V. reitzii* podem ser classificadas como sementes ortodoxas, e o processo de dessecação natural das mesmas é fator importante na germinabilidade e vigor das plântulas. Portanto, a metodologia de imersão das sementes de *V. reitzii*, diretamente no nitrogênio líquido (NL), sem necessidade de dessecação artificial previa ou uso de crioprotetores, configura-se uma ferramenta eficiente para um programa de conservação *ex situ* desta espécie.

**Palavras-chave:** Bromeliaceae, Armazenamento de semente, Nitrogênio líquido, *Vriesea*, Germinação, Anatomia.



## ABSTRACT

The native Atlantic Forest Bromeliad *Vriesea reitzii* is affected by increasing extractivism and anthropic devastation of its biogeographic area, leading it to be on the “vulnerable category” of endangered plants. To reduce this problem, the development of conservation protocols of genetic material is necessary. Thus, the aim of this study was to establish a cryopreservation protocol for *V. reitzii* seeds collected from fruits at three maturation times, 120, 135 and 150 days after anthesis. Water contents, germination percentage, germination rate index (GRI) and total soluble carbohydrates were determined. Optical and transmission electron microscopy (TEM) analyzes were carried out on cryopreserved and non-cryopreserved seeds, as a control. The highest and significant ( $p < 0.05$ ) mean percentage of moisture (17.6%) was observed in seeds collected at 120 days after anthesis, follow of 135 (14.6%) and 150 (14.4%) days. Seeds collected 150 days after anthesis, regardless of whether they were cryopreserved or not, had higher and significant ( $p < 0.01$ ) mean percentages of germination (89.6%). The highest and significant ( $p < 0.05$ ) average of GRI (17) was observed in the seeds collected at 150 days after anthesis, whereas in those collected at 120 (13.6) and 135 (14.4) days no differences were observed between them. The quantification of total soluble carbohydrates showed no significant difference between the different collection periods and with or without cryopreservation of the seeds. Morpho-histological analysis of the seeds, cryopreserved or not, showed no cellular damage and structural alterations. In addition, seed germination and seedling development were observed regardless of whether the seeds had passed through the cryogenic process. From these results, it can be inferred that the seeds of *V. reitzii* can be classified as orthodox seeds and their natural desiccation process is an important factor in germinability and vigor of the seedlings. Thus, the methodology of immersion of *V. reitzii* seeds, directly in liquid nitrogen (NL), without artificial desiccation or use of cryoprotectants, is an efficient tool for conservation program *ex-situ* of this species.

**Keywords:** Bromeliacea. Seed storage. liquid nitrogen, *Vriesea*, Germination, Anatomy.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Porcentagem média de água em sementes de *Vriesea reitzii* coletadas em diferentes dias após a antese (120, 135 e 150) .....41
- Figura 2 -Porcentagem média de germinação acumulada de sementes de *V. reitzii*, em relação ao tempo de coletas dos frutos (120, 135 e 150 dias após a antese) e ao dia em meio de cultura MS.....42
- Figura 3 - Secções longitudinais das sementes de *Vriesea reitzii* submetidas ao teste de Azul de toluidina (ATO) nos diferentes tempos de coletas (120, 135 e 150 dias após a antese) dos frutos comparando sementes criopreservadas e sementes não criopreservadas.....50
- Figura 4 - Secções longitudinais das sementes de *Vriesea reitzii* coradas com Azul de toluidina (ATO) e Lugol nos diferentes tempos de coletas dos frutos (120, 135 e 150 dias após a antese), comparação de sementes criopreservadas e não criopreservadas .....51
- Figura 5 - Secções longitudinais das sementes de *Vriesea reitzii* submetidas ao teste de Ácido periódico de schiff (PAS) nos diferentes tempos de coletas dos frutos (120, 135 e 150 dias após a antese) .....52
- Figura 6 - Secções transversais de sementes de *Vriesea reitzii* em microscopia de transmissão.....54



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Porcentagem média de germinação de sementes de *Vriesea reitzii* em três diferentes tempos de coletas dos frutos (120, 135 e 150 dias após a antese) e diferentes métodos de conservação (criopreservação e armazenamento a 4°C) após 15 dias em meio de cultura.....43

Tabela 2 - Índice de velocidade de germinação de sementes de *Vriesea reitzii* em três diferentes tempos de coletas dos frutos (120, 135 e 150 dias após a antese) e diferentes métodos de conservação (criopreservação e armazenamento a 4°C) após 15 dias em meio de cultura.....46

Tabela 3 - Conteúdos médios de carboidratos totais solúveis (mg/g) de sementes de *Vriesea reitzii* em três diferentes tempos de coletas dos frutos (120, 135 e 150 dias após a antese) e diferentes métodos de conservação (criopreservação e armazenamento a 4°C) .....47



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**ANOVA** – Análise de variância

**ATO** – Azul de toluidina

**b.u.** – Base úmida

**CBB** – Azul brilhante de coomassie

**DAA**– Dias após antese

**GE** – Glucose equivalente

**IVG** – Índice de velocidade de germinação

**LCME**– Laboratório Central de Microscopia Eletrônica

**LFDGV**– Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal

**MS** – Meio de cultura MS (Murashige e Skoog 1962)

**NL** - Nitrogênio líquido

**PAS** – Ácido periódico de schiff

**UFSC** – Universidade Federal de Santa Catarina

**μM**– Micromolar

**°C** – Grau (s) celsius



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>23</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>27</b>
2.1	A família Bromeliaceae e o gênero <i>Vriesea</i> .....	27
2.2	Estratégias de conservação.....	29
2.3	Alterações bioquímicas e anatômicas .....	30
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>33</b>
3.1	Objetivo geral.....	33
3.2	Objetivos específicos. ....	33
<b>4</b>	<b>MATÉRIAS E MÉTODOS .....</b>	<b>35</b>
4.1	Material Vegetal.....	35
4.2	Análise do teor de umidade das sementes.....	35
4.3	Criopreservação de sementes .....	35
4.4	Avaliação da germinação e IVG <i>in vitro</i> .....	37
4.5	Teor de carboidratos solúveis totais .....	37
4.6	Análises anatômicas .....	38
<b>4.6.1</b>	<b>Microscopia de luz .....</b>	<b>38</b>
<b>4.6.2</b>	<b>Análises anatômicas por microscopia de transmissão .....</b>	<b>38</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>41</b>
5.1	Teor de umidade das sementes.....	41
5.2	Germinação de sementes após conservação.....	42
5.3	Índice de velocidade de germinação (IVG).....	45
5.4	Teor de carboidratos solúveis totais .....	46
5.5	Análises anatômicas por microscopia de luz.....	48
5.6	Análises anatômicas por microscopia Eletrônica de transmissão .....	53
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>55</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>57</b>



## 1 INTRODUÇÃO

As Bromeliáceas são um dos grupos de plantas mais diversos da Mata Atlântica (Stehmann *et al.*, 2009), o qual é um dos biomas mais devastados e mais seriamente ameaçados do planeta devido ao rápido ritmo das mudanças que apresenta, e restando apenas de 7 a 8% de sua floresta original (Galindo-Leal e Câmara, 2005). O extrativismo de bromélias, ocasionado pelo aumento de seu uso ornamental, associado ao progressivo processo de devastação da Floresta Atlântica, provoca a redução da diversidade intra e interespecífica neste grupo de plantas, aumentando a ameaça de extinção de várias espécies (Cofanni Nunes, 2002; Pereira *et al.*, 2008). Entre as espécies de bromélias registradas na Mata Atlântica cerca de 40% se enquadram em alguma categoria de ameaça (Martinelli *et al.*, 2008). O gênero *Vriesea* Lindl. apresenta a maior riqueza de espécies desse bioma, com um total de 166 espécies, das quais 145 são endêmicas, no entanto, 15 espécies estão incluídas na categoria Criticamente em Perigo (CR), 18 Em Perigo (EP) e 57 Vulneráveis (VU), nesta última encontra-se a *Vriesea reitzii* (Martinelli *et al.*, 2008).

A informação disponível sobre os procedimentos de armazenamento *ex-situ* de espécies de bromélias do Brasil, ainda é incipiente, sendo essencial desenvolver programas eficazes para a conservação da flora nativa (Rodrigues *et al.*, 2014). Considerando que a conservação *ex-situ* compreende estratégias para possibilitar sua propagação e estratégias para a preservação do germoplasma em longo prazo, nas bromélias, o modelo baseado na cultura nodular (CNs) se apresenta como um método eficaz para a micropropagação em grande escala. No entanto, técnicas para a preservação em longo prazo têm sido pouco estudadas. Nesses sistemas de propagação o principal problema está associado com os elevados custos de trabalho e os requisitos de espaço, além dos riscos potenciais de variação somaclonal para algumas espécies (Blakesley *et al.*, 1996).

A criopreservação é a única técnica que garante a conservação segura e eficiente em termos de custo em longo prazo de diversas espécies de plantas, incluindo as raras e ameaçadas de extinção (Engelmann, 2011).

O sistema de criopreservação impõe uma série de condições de estresse no material vegetal que poderiam induzir mudanças nos tecidos criopreservados e nas novas plantas regeneradas. Portanto, antes de usar esta técnica rotineiramente para conservação em longo prazo dos recursos genéticos vegetais é necessário verificar que a estabilidade

genética do material criopreservado não seja perturbada (González-Arno e Engelmann, 2013).

Alguns trabalhos têm relatado que materiais *in vitro* após a criopreservação apresentam melhores respostas no crescimento e desenvolvimento, comparados com seus controles não criopreservados (Galerneet *et al.*, 1992; Aguilar *et al.*, 1993). Isto é devido à seleção efetuada pela exposição ao nitrogênio líquido, na qual morrem aquelas células mais diferenciadas, que não participam no crescimento da cultura, enquanto que as células mais meristemáticas, que são responsáveis pelo crescimento, permanecem vivas e reiniciam o crescimento muito rápido e intenso após o a elevação da temperatura. Ao contrário, as culturas *in vitro* não criopreservadas crescem mais lentamente, devido à grande proporção de células diferenciadas, que não proliferam ativamente (Engelmann, 2004). Desta forma, considerando que se têm elevadas taxas de indução de CNs a partir de sementes de bromélias, elas podem ser consideradas nas técnicas criogênicas. A criopreservação limita a perda por contaminação e o risco de variação somaclonal, a qual aumenta com a duração da cultura nas condições *in vitro*.

Apesar do grande interesse na questão da conservação em longo prazo mediante a criopreservação, muitas das pesquisas que estão sendo realizadas na América Latina, tais como, o desenvolvimento e aprimoramento de protocolos, obedecem às necessidades e interesses específicos das coleções e instituições que as abrigam. O recente desenvolvimento de estratégias para a conservação dos recursos genéticos vegetais, em nível regional e para culturas específicas, é apresentado como uma oportunidade para desenvolver um plano de ação comum para a criopreservação de espécies de interesse regional (González-Arno e Engelmann, 2013). De acordo com isso, o desenvolvimento de protocolos de criopreservação de plantas nativas no Brasil permanece limitado, sendo que a maioria dos esforços está dirigida a espécies economicamente importantes (Pilattiet *et al.*, 2011).

Considerando o grau de ameaça de extinção nas bromélias, é importante reconhecer que a conservação do DNA de espécies ameaçadas assegura a disponibilidade de "diversidade genética molecular", que pode ser usado para estudar a filogenia, a sistemática molecular, genômica comparativa, e prospecção de genes (Centro Nacional Recursos Genéticos, Embrapa, Brazil 2010; <http://www.cenargen.embrapa.br>). Devido ao importante papel ecológico das bromélias, e seus usos etnobotânicos entre eles o uso ornamental, é essencial implementar diferentes práticas efetivas e

eficientes dirigidas à conservação dessas espécies, as quais beneficiaram as populações da região e a humanidade em geral.

Para as espécies de bromélias nas quais seu sistema de cultura de tecidos e micropropagação foram estabelecidos, a criopreservação de material *in vitro* também é uma alternativa viável. Por outro lado, em algumas espécies da família Bromeliaceae foram observadas sementes com elevada tolerância para secagem e congelamento (Tarré *et al.*, 2007; Pereira *et al.*, 2010; Rodrigues *et al.*, 2014). Isto também é muito conveniente, considerando que a semente usada como explante para indução de CNs tem permitido bons resultados (Dal Vesco *et al.* 2014a; Corredor-Prado *et al.* 2015).

Diante do exposto, este trabalho tem por objetivos determinar o teor de umidade das sementes de *V. reitzii* coletadas em diferentes períodos após a antese, e, em seguida, os efeitos na eficiência regenerativa e na constituição anatômica e bioquímica de sementes de *V. reitzii* coletadas em diferentes períodos após a antese e submetidas a criopreservação e a conservação a 4°C.



## 2REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1A família Bromeliaceae e o gênero *Vriesea*.

No planeta terra, são reconhecidos 25 *hotspots* ou áreas biogeografias de elevada diversidade biológica, sendo o bioma Mata Atlântica um deles. Estima-se a existência de 20.000 espécies de plantas, das quais 8.000 são endêmicas deste bioma. A Mata Atlântica é um dos biomas mais ameaçados, especialmente pela ação antrópica, restando apenas de 7 a 8% da sua área de ocorrência original (Myers *et al.*, 2000; Galindo-Leal e Câmara, 2005).

A família Bromeliaceae é um componente importante do bioma Mata Atlântica, na qual são conhecidos 58 gêneros e 3.172 espécies e subespécies (Luther, 2008) ocorrendo nas regiões tropicais desde a América do Norte até a América do Sul. A distribuição no continente americano é muito ampla e apresenta a sua maior diversidade nos Neotrópicos, presente em altitudes de 0 a 4000 m e englobando diversos tipos de vegetação (Smith e Downs, 1974, 1979; Benzing, 2000). Somente a espécie *Pitcairnia feliciana* (A. Chev.) Harms e Mildbraed apresenta ocorrência no continente africano (Benzing, 2000). Das 803 espécies registradas na Mata Atlântica, 653 são consideradas endêmicas, e, aproximadamente 40% destas se enquadram em alguma categoria de ameaça (Martinelli *et al.*, 2008).

As bromélias são plantas herbáceas, tendo representantes de hábitos perenes, terrestres, epífitas e rupícolas (Souza e Lorenzi, 2005; Wanderley e Martins, 2007). Com 18 gêneros descritos, as bromélias epífitas são as principais representantes da família. Em alguns casos, estas têm sido denominadas, erroneamente, como parasitas, muitas vezes que é difundido erroneamente que as plantas se aproveitavam da seiva das árvores hospedeiras (Hornung-Leoni, 2011; Benzing, 1980).

Segundo Zotz e Hietz (2001), o habito epífito de algumas bromélias leva a diversas modificações e adaptações como a presença de ceras na superfície externa das folhas e o metabolismo CAM (metabolismo ácido das Crassuláceas). Estas modificações permitem a absorção de CO<sub>2</sub> durante a noite e a manutenção dos estômatos fechados durante o dia, evitando a perda de água por evapotranspiração. Ainda, algumas bromélias epífitas apresentam um mecanismo de absorção de nutrientes maior ao necessário metabolicamente, afim de obter reservas para os tempos de menor disponibilidade, conhecido como “consumo redundante” (Carranza-Quiceno e Estévez-Varón, 2008).

As bromélias são importantes componentes ecológicos, uma vez que estão associadas as mais variadas formas de vida e interações biológicas (Reitz, 1983; Rocha *et al.*, 1997). Algumas espécies, devido à disposição em roseta de suas folhas, oferecem um local de proteção e de acasalamento para diversos organismos e formas de vida, principalmente aquelas que formam tanques, além de oferecerem uma importante fonte de água e nutrientes (Rocha *et al.*, 1997; Benzing, 2000; Frank e Lounibos, 2009).

Para as bromélias, se reportam diferentes usos na cultura da América Latina desde tempos ancestrais. Hornung-Leoni(2011) destaca variados usos com 78 espécies de acordo com cada país de ocorrência, entre eles o uso como fonte de alimento, medicinal, fibra têxtil, uso cerimonial, combustíveis e como cercas vivas. No Brasil, os usos mais relevantes são o medicinal e como fibra têxtil. Além disso, o mesmo autor destaca que, das 78 espécies estudadas, 42,3% são usadas como ornamentais e em cerimônias.

Dentro da família Bromeliaceae, o gênero *Vriesea* é o mais rico em espécies no bioma Mata Atlântica, com um total de 166 espécies descritas, das quais 145 são endêmicas. Novos registros e ocorrência nas áreas de incidência têm aumentado a cada ano para este gênero, tanto no Brasil (Costa *et al.*, 2004; Leme and Ludovic, 2011; Versieux, 2008; Gomes da Silva e Souza-Chies, 2017; Kessous *et al.*, 2018;) como na Colômbia (Pico-v, 2016; Pico 2016) e na Costa Rica (Morales, 2014).

Diversos estudos foram desenvolvidos com plantas deste gênero. Por exemplo, em termos de multiplicação e propagação, Pulido-Rueda *et al.*, (2018) estudaram diferentes tipos de meios de cultura *in vitro* para o estabelecimento de *V. incurvata*, planta que apresenta dificuldades germinativa das sementes. Estes autores encontraram como resultado um porcentual meio de 82,8% de estabelecimento de plântula em meio de cultura com concentração de sais Murashige e Skoog (MS).

No entanto, vem se estabelecendo como uma nova metodologia de micropropagação protocolos baseados em cultura nodular (CNs), sendo descrito para bromélias como *V. reitzii* (Alves *et al.*, 2006; Rech Filho *et al.*, 2009; Dal Vesco e Guerra, 2010; Dal Vesco *et al.*, 2014a, b; Corredor-Prado *et al.*, 2015), *V. friburgensis* var. *paludosa* (Alves e Guerra, 2001; Corredor-Prado *et al.*, 2015), *Bilbergia zebrina* (Dal Vesco *et al.*, 2011) e *Ananas comosus* var. *comosus* (Scherer *et al.*, 2013). As CNs referem-se a um padrão de respostas morfogênicas com características distintas aos sistemas regenerativos tradicionais baseados na organogênese e embriogênese somática, apresentando um alto potencial regenerativo, chegando a regeneração de mais de 5.300

microbrotos/g de CNs de *V. reitzii* após 10 semanas de cultivo *in vitro* (Dal Vesco e Guerra, 2010). Além do estabelecimento de protocolos de introdução *in vitro*, descrições anatômicas e histoquímicas de sementes e culturas nodulares de plantas do gênero *Vriesea* também tem sido realizadas (Corredor-Prado *et al.*, 2014; Corredor-prado *et al.*, 2015; Corredor, 2012).

No entanto, a problemática de ameaça de extinção, no qual se enquadram grande quantidade de bromélia, onde *V. reitzii* se encontra na categoria VU (Martinelli *et al.*, 2008), junto ao progressivo processo de devastação de habitats, como a Mata Atlântica, associado ao extrativismo de bromélias para o uso ornamental, tem sido um dos principais motivos para a redução da diversidade específica, aumentando a ameaça de extinção de algumas espécies (Cofanni Nunes, 2002; Pereira *et al.*, 2008).

## 2.2 Estratégias de conservação

Segundo a Convenção sobre a Diversidade Biológica (ONU, 1992), a conservação *in situ* e *ex situ* são consideradas estratégias básicas de conservação. A primeira pode ser definida como “a conservação de ecossistemas e habitats naturais e, a manutenção e recuperação de populações viáveis de espécies em seu meio natural e, no caso de espécies domesticadas ou cultivadas, no meio em que desenvolveram suas propriedades distintas” (FAO, 1996). A segunda, por sua vez, refere-se à conservação dos componentes da diversidade biológica fora do seu habitat natural (González-Arno e Engelmann, 2013). Quanto à conservação *ex situ* de bromélias no Brasil a informação disponível é escassa, ainda que esta informação seja de grande importância para o desenvolvimento de programas eficazes para a conservação da flora nativa (Rodrigues *et al.*, 2014).

A criopreservação é considerada um sistema de armazenamento de longo prazo, na qual o material vegetal é armazenado em nitrogênio líquido a temperaturas ultrabaixas (-196 °C), interrompendo a divisão celular e a maioria dos processos metabólicos e físicos (González-Arno e Engelmann, 2013). Muitos protocolos de criopreservação têm sido desenvolvidos, mediante o uso de sementes, embriões zigóticos, gemas apicais, meristemas entre outros (Engelmann, 2003; Reed, 2008).

As células de plantas contêm grandes quantidades de água, principalmente células de calos, meristemas, botões e embriões. Algumas, dependendo da espécie, são extremamente sensíveis ao congelamento. Para evitar os danos que causa a cristalização da água

intracelular, o material vegetal deverá ser artificialmente desidratado ou protegido de alguma forma para evitar a morte celular (Meryman e Williams, 1985; Kulus e Zalewska, 2014).

De acordo com a espécie e tipo de tecido que se pretende conservar, diferentes técnicas de criopreservação são empregadas, como imersão direta em nitrogênio líquido, desidratação, encapsulamento-desidratação, vitrificação, encapsulamento-vitrificação, vitrificação-droplet, etc (Engelmann e Takagi 2000, Sakai 1995, Engelmann, 2004, Gonzalez-Arno *et al.*, 2008). Ainda, pode-se utilizar substâncias químicas de proteção, ou crioprotetores, as quais são soluções hiperconcentradas que fazem com que a água congele sem formar cristais de gelo, que também interagem e alteram a distribuição de água dentro e fora das células, desidratando-as (Uemura *et al.*, 2009).

A criopreservação, comparada com outras técnicas de conservação *ex situ*, apresenta vantagens muito favoráveis quanto à otimização de custos e processos. Uma vez que o material é armazenado em tanques criogênicos, o espaço para manter a coleção passa a ser muito menor, além disso o custo para o trabalho e a manutenção é mínima. Quando armazenadas, as amostras não são constantemente manipuladas, o que reduz significativamente o custo de conservação e regeneração do material vegetal (Villalobos e Engelmann, 1995).

Segundo Barbedo e Marcos Filho (1998), durante o período de formação e maturação das sementes, a água têm um papel fundamental na expansão e divisão celular, bem como no transporte dos fotoassimilados para armazenamento ou formação de tecidos. Desta maneira, até o final do desenvolvimento das sementes, as mesmas podem conter de 30 a 40% de massa representada pela água. Em sementes recalcitrantes, observa-se que o teor de água continua elevado, enquanto que, em sementes ortodoxas, geralmente ocorre redução rápida do teor de água, cujos valores se aproximam a 10% (Barbedo e Marcos Filho, 1998). Diante do exposto, a conservação de sementes ortodoxas por criopreservação é facilitada por não requerer pré-tratamento, uma vez que estas apresentam processos de desidratação natural e reduzida formação de gelos intracelular (Tarré *et al.*, 2007).

### 2.3 Alterações bioquímicas e anatômicas

As sementes são indivíduos independentes, que após a dispersão, visam desenvolver-se e colonizar um local diferente. Para isto, elas armazenam reservas nutritivas durante o processo de formação e maturação, principalmente carboidratos, lipídios e proteínas. Tais

reservas são usadas pelas sementes para manutenção e desenvolvimento do embrião até a formação da planta com capacidade autotrófica (Buckeridge *et al.* 2004).

As concentrações das principais substâncias de reserva podem variar de acordo com a espécie e o estágio de maturação em que as sementes se encontram (Motta Leduc, 2007). Entre estas reservas, os carboidratos constituem as principais substâncias armazenadas nas sementes, e tem como principal função fornecer energia necessária para a retomada do desenvolvimento do embrião durante a germinação (Barbedo e Marcos Filho, 1998). Os carboidratos solúveis de reserva e os de parede celular desempenham papel fundamental nos mecanismos de absorção de água, proteção do embrião contra a dessecação e a manutenção da viabilidade das sementes (Barbedo e Marcos Filho, 1998). Igualmente, aos carboidratos outorga-se a função de aquisição de tolerância à dessecação ligada à proteção das membranas durante a desidratação, principalmente a sacarose e rafinose pela alta correlação da tolerância à secagem e a composição de açúcares, como observado por Chen e Burris (1990) em sementes de milho quando submetidas a diferentes processos de secagem.

Sun *et al.*, (1994) estudou a relação entre a tolerância à dessecação e as modificações das fases de membrana, se tratando da retenção de líquidos cristalinos e do conteúdo de sacarose e estaquiose. Igualmente, Blackman *et al.*, (1992) em estudos de eixos embrionários de sementes de soja que foram submetidos a processos de secagem, observaram o aumento nos teores de sacarose e estaquiose. Porém, do modo contrário, quando as sementes não foram submetidas à secagem ou permaneciam sob umidade relativa elevada, os açúcares mencionados permaneciam sem alterações em suas concentrações, apresentando, assim, a função dos açúcares no processo de aquisição de tolerância à dessecação.

A conservação por criopreservação pode acarretar em alterações anatômicas no material. A alteração anatômica mais problemática em tecidos criopreservados é a ruptura do sistema de membranas causada pela formação de gelo no meio intracelular, podendo alterar a semi-permeabilidade e a compartimentação celular. Quando a água é submetida a temperaturas abaixo de  $-130^{\circ}\text{C}$ , a mesma pode-se apresentar em dois estados físicos: o estado cristalino, onde são formados cristais de gelo podendo danificar as células; e o estado vítreo, no qual a água adquire viscosidade com as propriedades mecânicas de um sólido. Este último é formado por sistema biológicos tolerantes à

dessecação, ou quando criopreservados sob baixa umidade (Santos, 2001).

Apesar da ocorrência de outras alterações estruturais, como a degeneração vacuolar e a redução no tamanho de grãos de amido nos plastídeos (Rowntree *et al.*, 2007), o sucesso dos protocolos de criopreservação é mais dependente da indução de tolerância à desidratação do que à tolerância ao resfriamento (STUSHNOFF e SEUFFERHELDL, 1995; Santos, 2001; Helliot *et al.*, 2003).

### 3OBJETIVOS

#### 3.1Objetivo geral.

O presente trabalho teve por objetivo estabelecer um protocolo de criopreservação de sementes de *Vriesea reitzii*, bem como avaliar os efeitos da criopreservação no material vegetal criopreservado.

#### 3.2Objetivos específicos.

- a) Determinar o teor de umidade das sementes de *V. reitzii* coletadas em diferentes períodos após a antese das infrutescências;
- b) Avaliar os efeitos da criopreservação sobre a capacidade germinativa e no índice de velocidade de germinação (IVG) das sementes para cada período de coleta das sementes;
- c) Caracterizar as possíveis alterações bioquímicas e anatômicas das sementes de *V. reitzii* submetidas ou não à criopreservação.



## 4MATÉRIAS E MÉTODOS

### 4.1Material Vegetal

Sementes de *V. reitzii* foram extraídas de frutos fisiologicamente maduros, coletados em uma população natural na localidade “Campo da Roça de Baixo”, município de Curitibanos (SC) (27°16'12.5"S, 50°32'09.3"W, 980 m de altitude). Os frutos foram coletados em três períodos diferentes: 120, 135 e 150 dias após antese (DAA) das infrutescências. Em seguida eles foram armazenados à 4°C no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal (LFDGV), no Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal de Santa Catarina (CCA/UFSC) até a realização dos experimentos.

### 4.2Análise do teor de umidade das sementes

Para avaliar o teor de umidade total (%) das sementes utilizou-se um *pool* de 1000 sementes de cada período de coleta dos frutos. Utilizou-se o método da estufa à  $103 \pm 2^\circ\text{C}$  durante  $17 \pm 1$  horas, de acordo com ISTA (2004), onde cada tratamento foi constituído de quatro repetições de 200 sementes. O teor de umidade expresso em base úmida foi obtido por meio da expressão (1):

$$X\% = \frac{P_i - P_f}{P_i} \times 100 \quad (1)$$

Onde:

P<sub>i</sub>: Peso inicial da amostra (g)

P<sub>f</sub>: Peso final da amostra (g)

X%: teor de água em porcentagem de base úmida (b.u), %.

### 4.3Criopreservação de sementes

Sementes de *V. reitzii* foram extraídas dos carpelos e foi realizada a excisão dos apêndices plumosos até 4 mm aproximadamente de todas elas, em seguida as sementes foram submetidas aos dois métodos de conservação estudados. O desenho experimental utilizado foi um fatorial 3x2 com seis tratamentos: três períodos de coleta (120, 135 e 150 dias a partir da antese) e dois sistemas de conservação de semente (criopreservação e armazenamento de semente a 4°C). Cada tratamento

contou com quatro repetições dispostas em blocos ao acaso e a unidade experimental foi constituída de um criotubo contendo 30 sementes.

Em relação aos fatores, foram realizados três períodos diferentes de coleta de sementes: 120, 135 e 150 dias após a antese (DAA). Em relação ao sistema de conservação de sementes, elas foram mantidas em geladeira a 4°C ou foram imersas diretamente em nitrogênio líquido (-196°C) e, após 24 horas, efetuou-se o descongelamento em banho-maria (2 minutos a 42°C).

Após 24 h realizaram-se os procedimentos para avaliar a capacidade germinativa e o índice de velocidade de germinação das sementes. Nesse sentido, as sementes foram coletadas dos sistemas de conservação, armazenamento a 4°C e nitrogênio líquido a -196°C, neste caso efetuou-se o descongelamento em banho-maria (2 minutos a 42°C). Sementes provenientes dos tratamentos avaliados foram desinfestadas segundo o método descrito por Alves *et al*, (2006) e Guerra e Dal Vesco (2010), com modificações. Em seringas estéreis de 10 ml, as sementes foram imersas em álcool (70%) por 2 minutos, e em solução de 1% de hipoclorito de sódio com 1 gota de Tween 20 a cada 100 ml de solução por 3 horas sob agitação. Na sequência, foram feitas mais 3 trocas de 10 min da mesma solução de hipoclorito de sódio para um total de 30 min adicionais e três enxágues consecutivos com água deionizada estéril.

Após a desinfestação as sementes foram inoculadas em placas de Petri plásticas estéreis, sobre papel filtro esterilizado e, embebido com 2ml de meio de cultura líquido composto pela formulação salina de MS (Murashige e Skoog, 1962), adicionado de vitaminas de Morel (Morel e Wetmore, 1951) e 30g L<sup>-1</sup> de sacarose. O pH foi ajustado para 5,8, antes da esterilização do meio de cultura em autoclave por 20 min a 121°C e 1,3 atm de pressão. Em seguida o meio foi vertido nas placas de Petri, sob assepsia em câmara de fluxo laminar. As culturas foram mantidas em câmara BOD (Byosistem Organized Development) à 25°C ± 2°C e fotoperíodo de 16 horas a uma intensidade luminosa de 55±5µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

Todos os dados foram analisados considerando-se os efeitos dos dias após antese para colheita e efeito da criopreservação. Dados originais foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e teste de comparação de médias (Tukey, 5%), utilizando o programa estatístico R (R Development Core Team, 2011). Quando não observada diferença significativa para um dos fatores no modelo bifatorial, utilizou-se o critério de seleção de modelos de Akaike, para seleção dos novos modelos de comparação de médias (Akaike, 1983; 1987).

#### 4.4 Avaliação da germinação e IVG *in vitro*.

Para as avaliações de velocidade de germinação (IVG) e da porcentagem total de germinação, foram efetuadas avaliações diárias até o 15º dia da inoculação, a partir de cada tratamento descrito no item 4.3. Consideraram-se sementes germinadas aquelas que apresentaram em conjunto intumescência do embrião, o rompimento do envoltório seminal e leve coloração verde como sinal de metabolismo ativo. Ao final do teste, foi avaliada a porcentagem de germinação e calculado o índice de velocidade de germinação (IVG), onde de acordo com Maguire (1962) empregou-se a fórmula:

$$IVG = \sum (Gi/ni) \text{ na qual,} \quad (2)$$

$G_i$  = número de sementes germinadas e;  $n_i$  = dia da contagem.

#### 4.5 Teor de carboidratos solúveis totais

O teor de carboidratos totais foi determinado utilizando o método fenol-sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956). Amostras com 200 mg de sementes, provenientes dos diferentes tratamentos descritos no item 4.3, foram maceradas com nitrogênio líquido até obtenção de um pó fresco. Em seguida, o material macerado foi transferido para o processo de extração de carboidratos em tubos falcon de 15 mL, nos quais foram adicionados 0,4 ml de etanol (80% a -22°C e mantidos em banho-maria a 70°C por 5 minutos. Os extratos foram centrifugados a 3.000 rpm por 10 minutos e ao final foi coletado o sobrenadante. O processo de extração foi repetido por 3 vezes. Após estes procedimentos o sobrenadante foi filtrado usando lã de vidro e o volume ajustado para 2 ml com etanol 80% a -22 °C. Em seguida, adicionou-se 50 µl do extrato a 450 µl de água destilada, 0,5 ml de fenol (5%) e 2,5 ml de ácido sulfúrico (96%). O teor de carboidratos totais foi estimado a partir de uma curva padrão determinada com base em um carboidrato padrão Glucose e com absorbância medida a 490 nm em espectrofotômetro (Pró-Análise, V-1600).

## 4.6 Análises anatômicas

### 4.6.1 Microscopia de luz

Amostras representativas das sementes, provenientes dos diferentes tratamentos descritos no item 4.3 antes da inoculação nas placas, foram fixadas em solução paraformaldeído (2,5% em tampão fosfato 0,2M pH 7,2) por 72 horas à 4°C. Em seguida, o material foi lavado em tampão fosfato e desidratado em série etílica crescente (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100%), com duas trocas de 15 minutos em cada concentração. Para a pré-infiltração das amostras, utilizou-se uma solução de etanol (100%) e historesina glicol metacrilato (GMA) (1:1, v/v) durante 6 horas. Posteriormente, o material foi infiltrado em resina pura por 24 horas. Para a inclusão, utilizou-se a mesma resina com adição de polimerizador e com ajuda de histo-moldes à 35°C em estufa por 24 horas, segundo Arnold *et al.* (1975) com modificações.

Secções (5µm) foram obtidas usando micrótomo de rotação (Leica RM 2135) equipado com navalhas de tungstênio. As secções foram distendidas em lâminas sobre gotas de água destilada e em seguida secas a 37°C em placa quente por 30 minutos. Em seguida, parte das amostras foram coradas com azul de toluidina (ATO) para identificação dos polissacarídeos ácidos, lugol para identificação de amido e outra parte com ácido periódico de Schiff (PAS) para identificação de polissacarídeos neutros (amido e celulose).

Os materiais foram analisados em microscópio óptico (Olympus BX40) e aspectos relevantes foram registrados por micrografias com o uso de sistema de captura de imagem (Olympus Q-Color-3C América Ind.).

### 4.6.2 Análises anatômicas por microscopia de transmissão

Amostras representativas das sementes, provenientes dos diferentes tratamentos descritos no item 4.3, foram fixadas em solução de glutaraldeído (2,5%) em tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,2 e sacarose 0,2 M a 4°C *overnight*, de acordo com os procedimentos recomendados por Pueschel (1979). Na sequência, realizou-se cinco lavagens da solução tampão cacodilato de sódio 0,3 M, pH 7,2, sacarose 0,6 M e H<sub>2</sub>O, reduzindo em 25% concentração de sacarose em cada lavagem. Em seguida, o material foi pós-fixado em solução de tetróxido de ósmio (2%) e cacodilato de sódio 0,2 M, pH 7,2 (1:1, v/v), durante 4 horas em temperatura ambiente. As amostras foram, então, lavadas em

solução tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,2 e desidratadas em séries crescentes de acetona (30, 50, 70, 90 100° Gl). Posteriormente, as amostras foram pré-infiltradas em série de soluções de acetona e resina Spurr (3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3) e infiltradas em resina Spurr (SPURR, 1969).

Para a polimerização das amostras, utilizou-se moldes horizontais e resina pura, em estufa a 70°C por 24 horas. Secções semifinas, de 700nm de espessura, foram feitas com navalha de vidro, a fim de selecionar as regiões para serem analisadas. Secções ultrafinas, de 60 nm de espessura, foram feitas com navalha de diamante em ultramicrotômo Power Tome XL e contrastadas com acetato de uranila (1%) e citrato de chumbo (1%), conforme Reynolds (1963). As observações e registro de imagens foram realizadas em Microscópio Eletrônico de Transmissão Jeol JEM1011 (Tokio, Japão) no LCME-UFSC, e os eventos relevantes foram registrados em micrografias.

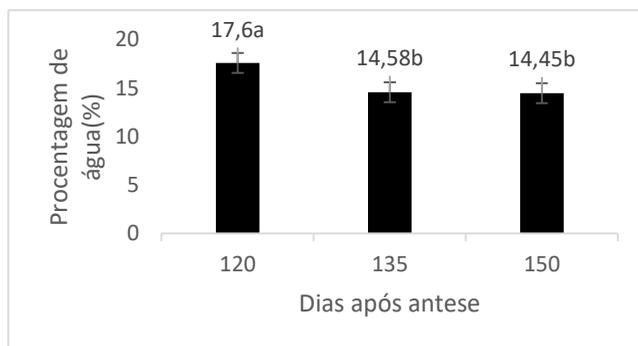


## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir das observações realizadas neste trabalho, foi possível descrever as principais inferências sobre os efeitos da coleta dos frutos em diferentes dias após antese (DAA) e os efeitos das diferentes metodologias de conservação em sementes da bromélia *V. reitzii*.

### 5.1 Teor de umidade das sementes

A maior e significativa ( $p < 0,05$ , Anexo 1) porcentagem média de água (17,6%) presente nas sementes foi observada em sementes coletadas aos 120 DAA, quando comparadas àquelas coletadas aos 135 (14,6%) e 150 (14,4 %) DAA (**Figura 1**).



**Figura 1.** Porcentagem média de água em sementes de *Vriesea reitzii* coletadas em diferentes dias após a antese (120, 135 e 150). \*Médias seguidas de letras diferentes indicam valores significativos pelo teste Tukey à 5% de significância. CV (%) = 11,8%

A partir do teor de água avaliado no presente trabalho, pode-se inferir que as sementes de *V. reitzii* tem um comportamento no conteúdo de água observado nas sementes ortodoxas. Observou-se também que, este tipo de semente apresenta um processo de dessecação natural e está relacionado, diretamente, com o grau de maturidade. Isto está de acordo com Barbedo e Marcos Filho (1998) que confirmam que o comportamento da quantidade de água nas sementes ortodoxas tende a reduzir à medida que a semente passa pelo processo de maturação, a dessecação, como observado no presente estudo.

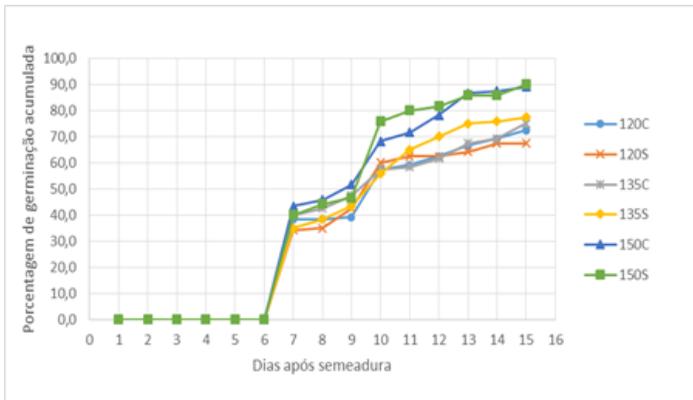
Em sementes de abacaxizeiro (*Ananas comosus* (L.) Merrill), espécie representante da família Bromeliaceae, Moraes (2007) observou baixo conteúdo de água 6 a 15% b.u. e tolerância à dessecação,

classificando-as como sementes ortodoxas. Esta classificação corrobora com a proposta pelo presente estudo para *V. reitzii*.

Embora diferentes autores tenham descrito diferentes variações no percentual de umidade das sementes, para considerá-las do tipo ortodoxa, Engelman & Dussert, (2000) sugerem que o teor de umidade deve permanecer entre 10 a 20%. Porém, Marzalina & Krishnapillay (1999) indicam que este deve estar abaixo de 20%; e Stanwood (1985) considera que o teor não pode ser superior a 10%.

## 5.2 Germinação de sementes após conservação

O início da germinação das sementes foi observado a partir do 7º dia de cultivo (**Figura 2**). A maior e significativa ( $p < 0,01$ ) porcentagem média de germinação foi de 89,6% quando se utilizou sementes coletadas aos 150 DAA, diferindo significativamente, quando comparado com 120 e 135 DAA (**Figura 2 e Tabela 1**). Este fator, revela que o tempo de coleta pode influenciar no total de sementes germinadas. No entanto, não foram observadas diferenças significativas na porcentagem de germinação, na interação dos fatores, de acordo com a análise de variância (Anexo 2), quando comparou-se a metodologia de conservação em determinado tempo de coleta. Ou seja, os processos de conservação de sementes estudados (criopreservação ou armazenagem a 4°C) não influenciaram significativamente na porcentagem de germinação (**Tabela 1**).



**Figura 2.** Porcentagem média de germinação acumulada de sementes de *Vriesea reitzii*, em relação ao tempo de coletas dos frutos (120, 135 e 150 dias após a antese) e ao dia em meio de cultura MS. C= criopreservadas, S= sem criopreservação.

**Tabela 1.** Porcentagem média de germinação de sementes de *Vriesea reitzii* em relação a três diferentes tempos de coletas dos frutos (120, 135 e 150 dias após a antese) e submetidas a criopreservação e armazenamento a 4°C (Arm. 4°C) após 15 dias em meio de cultura.

Tratamento	Dias após antese			Média
	120	135	150	
Criopreservadas	72,5	75,0	89,2	78,9A
Arm. 4°C	67,5	77,5	90,0	78,3A
Média	70,0b	76,3b	89,6a	78,6
CV%	9.3%			

\*Médias seguidas de letras diferentes indicam valores que diferem para o teste Tukey (5%). Maiúscula para coluna e minúscula para linha.

Tarré *et al.* (2007), estudando diferentes espécies de *Encholirium* e *Dyckia* (Bromeliaceae), não encontraram efeitos negativos da criopreservação sobre a germinação das sementes. O que eles verificaram é que, para algumas espécies, ocorreu um leve aumento no percentual de germinação. Neste estudo, o efeito da criopreservação não aumentou as porcentagens de germinação. De qualquer maneira, assim como as espécies estudadas por Tarré *et al.* (2007), as sementes de *V. reitzii* suportaram os efeitos do processo de criopreservação, com a diferença de não se apresentar diferença estatística significativa para as médias das sementes criopreservadas (78,9%) e não criopreservadas (78,3). Desta maneira, pode-se afirmar que o processo criogênico não tem efeito nem positivo nem negativos sobre a germinabilidade das sementes do presente estudo, assim como na sobrevivência.

Caetano (2012) estudou o efeito da criopreservação em sementes de Cajuzinho do cerrado (*Anacardium othonianum* Rizz) em diferentes tempos de armazenamento, e concluiu que o comportamento germinativo das sementes foi igual ao das sementes não criopreservadas. Por outro lado, Martins (2009), em sementes de Ipê-Roxo (*Tabebuia impetiginosa* (Mart. ex DC.) Standl.) observou que nos teores de umidade de 12,5, 8,4 e 4,2% as sementes mantiveram o desempenho fisiológico quando submetidas ao nitrogênio líquido. Porém, quando o teor era de 18,3% foi observado declínio na germinação. No presente estudo observou-se que as sementes de *V. reitzii* com teores de 17,6% de umidade, mantiveram um percentual germinativo em mais de 70% (120 DAA), após o processo de criopreservação, porém, menor que quando

as sementes estavam com 14,4%, quando o percentual germinativo foi de 89,6%.

Existem trabalhos que apresentam incremento do percentual germinativo de sementes após a criopreservação, nas quais o processo de resfriamento a temperaturas ultra baixas pode atuar na quebra de dormência. Por exemplo, estudos de Rocha *et al.* (2009), que verificaram que em diferentes períodos de criopreservação as sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* L.), tiveram aumento no percentual de germinação e no vigor, após as mesmas passarem pelo processo de criopreservação. Em sementes de Mamona (*Ricinus communis* L.) com teores de água de 4 a 10%, a capacidade germinativa foi incrementada quando as sementes passaram pelo processo de criopreservação por um período de 30 dias (Almeida *et al.*, 2002).

Sementes de *V. reitzii* só apresentaram incremento no percentual de germinação quando submetidas ao processo de desinfestação por 12 horas causando uma escarificação total na região do embrião (dados não apresentados). Vale salientar que este efeito pode estar relacionado diretamente com a escarificação das sementes, pois as sementes inteiras foram submetidas a assepsia e ao processo criogênico, mas sementes podem senescer ou até morrer com a escarificação e a desinfestação.

Os trabalhos apresentados nesta dissertação podem influenciar positivamente quando se tem por objetivo o armazenamento ou conservação, pois o uso de sementes com menor conteúdo de água inicial pode ser um importante fator quando submetidas ao processo de criopreservação, por revelar maior percentual de germinação. Portanto, o método de criopreservação se torna um mecanismo eficaz para a conservação de sementes para a espécie *V. reitzii* em sistema *ex situ* por longo prazo.

O grau de maturidade das sementes, relacionado aos diferentes dias de coleta após da antese, pode influenciar significativamente na germinação e na sobrevivência das sementes. Com este estudo é possível afirmar para sementes de *V. reitzii*, que elas podem ser criopreservadas sem tratamento prévio de dessecação, pois não houve alteração no poder germinativo das sementes.

Trabalhos semelhantes ao presente estudo, que associam a coleta das sementes em diferentes períodos de maturação das sementes (dias após antese) e criopreservação são raros na literatura científica. No entanto, estudos de caracterizações bioquímicas e germinação de sementes de *Caesalpinia echinata*, coletadas no 45º e no 55º dia após a antese e armazenadas a temperaturas criogênicas, revelou que estas não são tolerantes aos processos de dessecação artificial, sendo este

prejudicial para sementes, principalmente para as mais imaturas (MELLO, 2013). Este autor verificou que, sementes mais maduras apresentaram melhores resultados de germinação após armazenamento. Estes resultados corroboram com o presente estudo e revelam ser um fator importante na elaboração de um protocolo de criopreservação de sementes, tanto de monocotiledôneas quanto de dicotiledôneas.

Estudos com a presença e/ou ausência de mucilagem em sementes das bromélias *Nidularium innocentii* (Lem.) e *Nidularium procerum* (Lindm) em diferentes estádios de maturação revelaram incremento nos percentuais de germinação, quando as sementes imaturas de *N. innocentii* permaneceram com a mucilagem, comparadas com as sementes que tiveram esta retirada (Pereira, 2009). Este autor verificou também que, em sementes mais maduras, não se observa diferença significativa com a retirada ou não da mucilagem e que provavelmente, há outros fatores como os conteúdos e disponibilidade de reservas que podem influenciar no processo de germinação. Segundo este mesmo autor, não foi verificada diferença na germinação de sementes de *N. procerum* em quatro estádios de maturação, atribuindo os resultados à possibilidade de não serem muito diferentes entre si, já que os mesmos foram selecionados por aparência externas dos frutos. Os resultados, em ambas as espécies estudadas pelo autor, corroboram que os estádios ou grau de maturação das sementes, podendo influenciar diretamente na germinação, como observado no presente estudo.

### 5.3 Índice de velocidade de germinação (IVG)

O maior e significativo ( $p < 0,05$ ) índice de velocidade de germinação médio (17) foi observado quando se utilizou sementes coletadas aos 150 dias, quando comparado com 120 e 135 dias após a antese (**Tabela 2**). Novamente, o uso do processo ou não da criopreservação não influenciou significativamente no IVG (Anexo 4).

O período de coleta das sementes teve efeito significativo sobre a IVG, por isto, foi utilizado um novo modelo de análise onde avaliou-se o IVG em função do tempo de maturação e dessecação dos frutos, em dias após a antese (**Tabela 2**; Anexo 5).

A partir deste resultado pode-se inferir que o período de coleta dos frutos e extração das sementes é um importante fator a ser observado, onde o aumento do tempo após a antese proporciona maiores percentuais de germinação e IVG em virtude do menor conteúdo de água, maior maturação ou formação do embrião e acúmulo de reservas.

**Tabela 2.** Índice de velocidade de germinação de sementes de *Vriesea reitzii* em três diferentes tempos de coletas dos frutos (120, 135 e 150 dias após a antese) e submetidas a criopreservação e armazenamento a 4°C (Arm. 4°C), após 15 dias em meio de cultura.

Tratamento	Dias após antese			Média
	120	135	150	
Com crio	13,8	14,3	16,9	15,0A
Arm. 4°C	13,5	14,5	17,0	15,0A
Média	13,6b	14,4b	17,0a	15,0
CV%	13,2%			

\*Médias seguidas de letras diferentes indicam valores que diferem para o teste Tukey (5%). Maiúscula para coluna e minúscula para linha.

Neste contexto, pode-se inferir que a dessecação natural das sementes decorrentes dos estádios de desenvolvimento interfere diretamente na qualidade e vigor das sementes para serem utilizados em programas de conservação, tal como, o uso na criopreservação e/ou processos biotecnológicos.

Estas mesmas variáveis, foram estudadas por Souza (2012) e Souza *et al.*, (2015) para sementes de duas espécies do *Hymenaea*, as quais mostraram diferenças em percentuais de germinação e IVG quando foram armazenadas por diferentes períodos de tempo e diferentes temperaturas. Corroborando então, que o IVG pode ser afetado nas mesmas famílias e espécies por diferentes aspectos. Deste modo, o IVG é uma característica que, ao ser analisada conjuntamente com outros parâmetros como germinação e umidade, fornece informações importantes sobre o vigor e a capacidade das sementes de suportar tratamentos como a dessecação e a criopreservação.

#### 5.4 Teor de carboidratos solúveis totais

O teor médio de carboidratos totais solúveis para sementes de *V. reitzii*, em relação ao período de coleta, dias após a antese e submetidas ou não a criopreservação, revelaram valores não significativos (**Tabela 3**, Anexo 6). No entanto, observa-se uma tendência no acúmulo do conteúdo de carboidratos solúveis nas sementes em relação ao aumento do período de coleta.

Os carboidratos estão associados a capacidade da semente de suportar dessecações e armazenamentos a temperaturas negativas, dentre outras características estruturais e bioquímicas (Barbedo & Marcos

Filho, 1998). A partir disto pode-se inferir que, uma maior permanência dos frutos após a antese representa um maior acúmulo de carboidratos, uma vez que, de acordo com os resultados do presente estudo quanto maior os DAA para a coleta dos frutos de *V. reitzii*, maior a perda de água nas sementes. Ressalta-se também que talvez seja necessário para o estudo desta variável, realizar análises complementares dos diferentes tipos de carboidratos em relação ao processo de criopreservação e tempo de coleta com um maior número de amostras para cada tratamento. Em estudo de sementes de *Caesalpinia echinata*, foram analisados os conteúdos de carboidratos solúveis totais em sementes, antes e após da criopreservação, como resultado os autores não constataram diferença em carboidratos do citoplasma e carboidratos estruturais (Zanotti *et al.*, 2012). Este estudo apresentou um resultado semelhante, pois o conteúdo de carboidratos solúveis totais não foi diferente em sementes criopreservadas e não criopreservadas (**Tabela 3**).

**Tabela 3.** Conteúdos médios de carboidratos totais solúveis (mg/g) de sementes de *Vriesea reitzii* em três diferentes tempos de coletas dos frutos (120, 135 e 150 dias após a antese) e diferentes métodos de conservação (criopreservação e armazenamento a 4°C).

Tratamento	mg/g*			Média
	Dias após antese			
	120	135	150	
Com crio	0,40	0,41	0,47	0,43A
Arm. 4°C	0,34	0,39	0,46	0,40A
Média	0,37a	0,40a	0,47a	0,41
CV%	30,5%			

\*Valores expressados em mg de glucose equivalente (GE) por cada 1g de sementes, a partir de curva padrão com  $R^2 = 0.9989$ . Médias seguidas de letras diferentes indicam valores que diferem para o teste Tukey (5%). Maiúscula para coluna e minúscula para linha.

Segundo Mollo *et al.*, (2011), os carboidratos em adaptações ao frio, em *Alcantarea imperialis* (Bromeliaceae), sofrem mudanças apreciáveis. Os autores descrevem que os conteúdos de sacarose em plantas em condições de frio podem ser trocados por trealose, rafinose e estaquiose. Também relatam, que as concentrações de amido mudaram com a presença do frio, possivelmente reduzido para carboidratos associados a tolerância e proteção da planta ao frio. Neste contexto, há necessidade também, de realizar análises complementares quanto a

caracterização dos diferentes tipos de carboidratos em relação ao tempo de coleta e processo de armazenamento de sementes em nitrogênio líquido.

### 5.5 Análises anatômicas por microscopia de luz.

Os resultados da composição anatomia das sementes de *V. reitzii*, nos diferentes dias após a antese, e nos dois sistemas de conservação de sementes estudados revelaram que não existiu dano mecânico, ruptura de parede celular ou dano no sistema de membranas. No entanto, foram observadas diferenças nos conteúdos de compostos químicos entre as regiões do tegumento, do endosperma, da camada de aleurona e do embrião (**Figura 3a-f**).

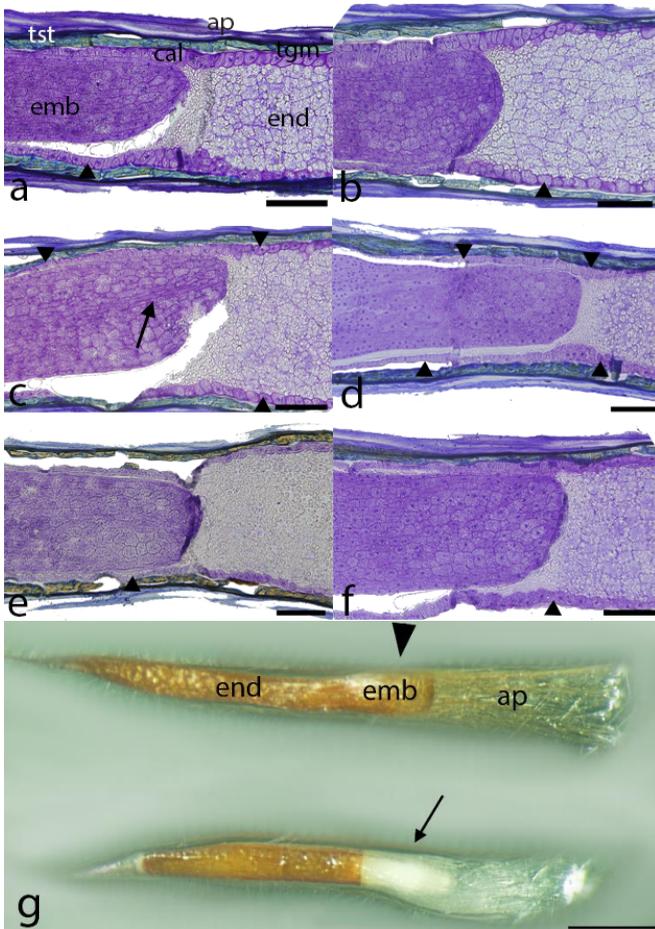
A partir desse trabalho foi observado que as sementes apresentaram duplo tegumento, o primeiro denominado testa (tegumento externo) e o segundo tégmen (tegumento interno), sendo assim classificadas como bitegumentadas (Souza, 2009; Corredor, 2012). As seções longitudinais tratadas com ATO mostraram coloração esverdeada no tégmen, o que indica a presença de compostos de natureza fenólica, como lignina; coloração verde escuro na testa, indicando presença de compostos tânicos; e, coloração roxa nos apêndices plumosos, indicando composição rica em pectinas (**Figura 3a, b**) (Corredor, 2012; Ventrella *et al.*, 2013).

Na região do endosperma foram observados grãos que reagiram ao teste Lugol (**Figura 4a - f**) e ao PAS (**Figura 5a - f**), os quais foram identificados como amido e polissacarídeos neutros, respectivamente. Os grãos de amidos encontraram-se distribuídos em alta concentração formando amiloplastos simples e compostos no citoplasma (**Figura 5e, f**). Os polissacarídeos neutros foram observados como constituintes da parede celular, como visto também para a camada de aleurona, indicando a presença de celulose (**Figura 5a - f**).

Na região do embrião, foi observada a reação metacromática ao ATO apresentando presença de compostos ácidos (**Figura 3a - f**), onde os núcleos das células embrionárias reagiram com uma coloração roxa escura. Quando tratadas com PAS, observou-se uma reação positiva nas paredes das células, indicando, assim, conteúdo de polissacarídeos estruturais (imagem não apresentada). Na sequência, com o teste do Lugol, observou-se ausência de conteúdos de amido nesta região.

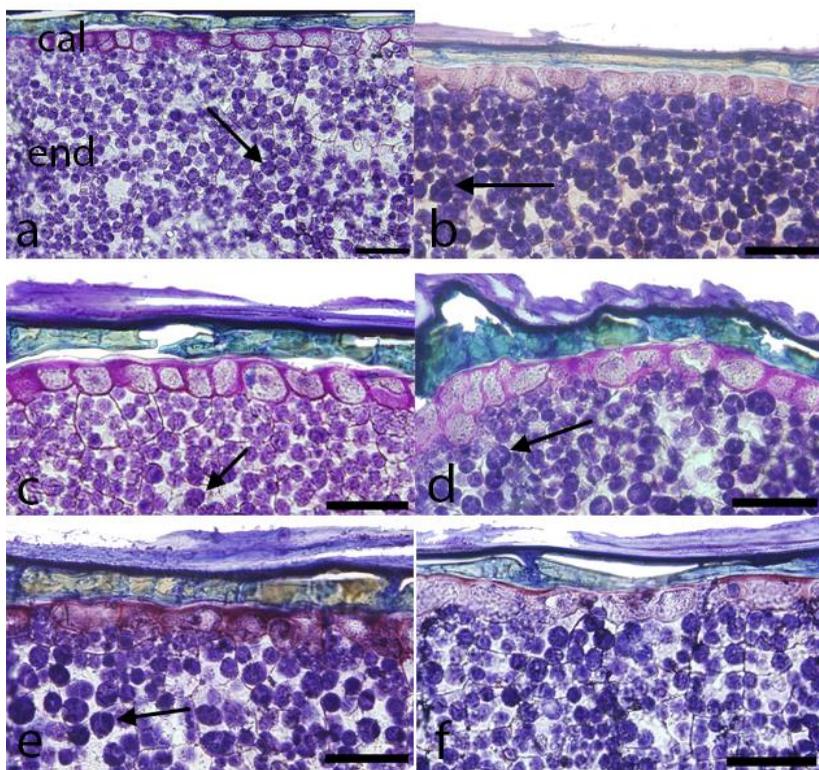
A camada de aleurona apresentou-se rodeando o endosperma e o embrião como uma camada de células de parede engrossada, que quando tratadas com ATO reagiram metacromaticamente indicando a

presença de polissacarídeos ácidos no citoplasma e na parede celular (Figura 3), como também foi observado por Corredor (2012). De acordo com os testes histoquímicos realizados com PAS, foi evidente a ausência de grãos de amido nas células da camada de aleurona (**Figura 4c e 5a**), assim como a presença de polissacarídeos neutros fazendo parte da parede celular da camada de aleurona (**Figura 5a - f**). As sementes criopreservadas, quando comparadas com as armazenadas a 4° C, não evidenciam diferenças nos compostos bioquímicos nas células da camada da aleurona.

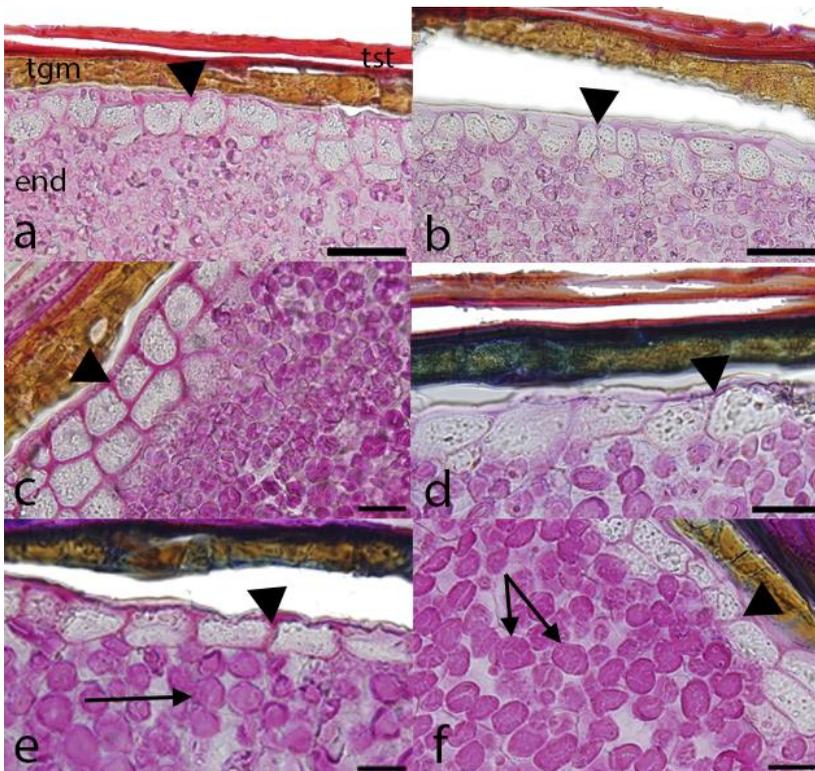


**Figura 3.** Secções longitudinais das sementes de *Vriesea reitzii* submetidas ao teste de Azul de toluidina (ATO) nos diferentes tempos de coletas (120, 135 e 150 dias após a antese) dos frutos comparando sementes criopreservadas (a, c, e) e sementes não criopreservadas (b, d, f): sem observar lise celular e danos estruturais nas paredes das células do embrião e do endosperma pelo processo criogênico. A camada de aleurona rodeando o embrião e o endosperma (cabeça de setas) a) sementes de 120 DAA submetidas a criopreservação; b) sementes de 120 DAA não criopreservadas; c) sementes de 135 DAA submetidas a criopreservação, observa-se a presença do procâmbio (seta); d) sementes de 135 DAA não criopreservadas; e) sementes de 150 DAA submetidas a criopreservação; f) sementes do 150 DAA não criopreservadas; g) sementes de *V. reitzii*, se observa sementes em estado normal (cabeça de seta), apresentando efeito de escarificação devido ao processo de desinfestação (seta). ap: apêndices

plumosos; end: endosperma; cal: camada de aleurona; emb: embrião. Barra: a-f): 100  $\mu$ m; g): 1mm.



**Figura 4.** Secções longitudinais das sementes de *Vriesea reitzii* coradas com Azul de toluidina (ATO) e Lugol nos diferentes tempos de coletas dos frutos (120, 135 e 150 dias após a antese), comparação de sementes criopreservadas (a, c, e) e não criopreservadas (b,d,f), sem observar mudanças nas estruturas nem lise celular. Observa-se grãos de amido compostos (seta), a) sementes de 120 DAA submetidas a criopreservação; b) sementes de 120 DAA não criopreservadas; c) sementes de 135 DAA submetidas a criopreservação d) sementes de 135 DAA não criopreservadas; e) sementes de 150 DAA submetidas a criopreservação; f) sementes de 150 DAA não criopreservadas. end: endosperma; cal: camada de aleurona. Barra: 50  $\mu$ m.



**Figura 5.** Secções longitudinais das sementes de *Vriesea reitzii* submetidas ao teste de Ácido periódico de schiff (PAS) nos diferentes tempos de coletas dos frutos (120, 135 e 150 dias após a antese). Nas secções das sementes criopreservadas não se observa dano estrutural ou lises celular. a) sementes de 120 DAA submetidas a criopreservação; b) sementes de 120 não criopreservadas; c) sementes de 135 DAA submetidas a criopreservação d) sementes de 135 DAA não criopreservadas; e) sementes de 150 DAA submetidas a criopreservação; f) sementes de 150 não criopreservadas, observa-se grãos de amido compostos (seta). Cabeças de setas indicando presença de polissacarídeos neutros. end: endosperma; cal: camada de aleurona. Barra: a) -b) = 50  $\mu$ m; c) -f) = 20  $\mu$ m.

Nos testes bioquímicos realizados, não foram evidentes mudanças estruturais nem bioquímicas, corroborando assim, os resultados discutidos nos literais 5,2 e 5,3 onde a criopreservação não teve efeito sob as sementes. As diferenças atribuídas aos estádios de maturação sob a germinação e o IVG, comparadas também com os conteúdos de

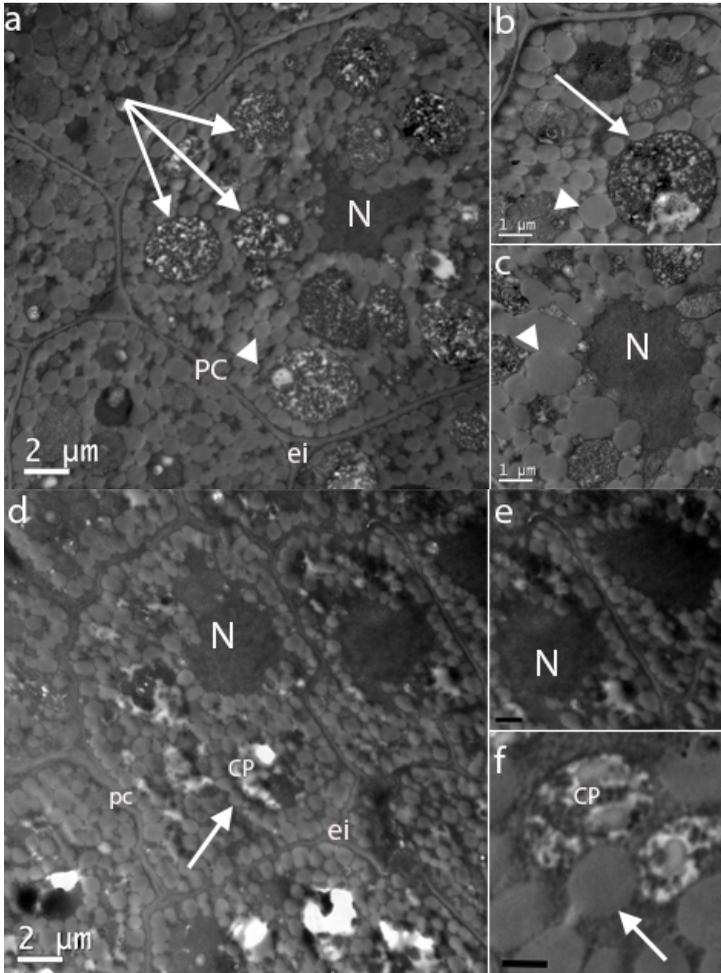
carboidratos, que também não apresentaram diferenças, poderiam indicar que o fator determinante para a sobrevivência das sementes está mais relacionado ao conteúdo de água e ao estágio de desenvolvimento das sementes ao serem coletadas, do que a mudanças bioquímicas e estruturais causadas pelo tratamento criogênico.

#### 5.6 Análises anatômicas por microscopia Eletrônica de transmissão

Células do embrião foram observadas mediante microscopia de transmissão, puderam ser visualizados corpos protéicos, corpos lipídicos, núcleo, parede celular e o espaço intercelular (**Figuras 6a, d**). Estas estruturas foram igualmente encontradas por Moura *et al.* (2010) em células de embrião somático de *Acrocomia aculeata* (Arecaceae).

Na observação das estruturas internas das células de sementes de *V. reitzii* sem processo de criopreservação, foi evidenciado o estado natural das membranas e organelas, assim como a parede celular das células. Comparando com células de sementes criopreservadas (**Figura 6a-c**), observou-se que as membranas do núcleo (**Figura 6d-f**), assim como a parede celular, não sofreram danos, modificações ou lises. Em ambos os casos, com e sem criopreservação, foram observados corpos protéicos e corpos lipídicos fazendo parte da estrutura interna das células, além da não ocorrência de injúrias nestas organelas.

Para a germinação das sementes, os componentes de reserva são moléculas importantes. Durante esse processo os compostos são degradados e usados para gerar energia e produção de matéria-prima para construção de novos tecidos e células (Mayer e Poljakoff-Mayber, 1975). As principais fontes de carbono reduzido nas sementes são representadas como os lipídios, os óleos e as graxas armazenadas, especialmente triglicerídios, que são moléculas com três hidroxilos dos grupos do glicerol por enlaces ester (Buchanan *et al.*, 2000). As reservas de aminoácidos ocorrem em células especializadas em sementes e órgãos vegetativos apresentadas como proteínas, entre as mesmas as mais comuns são as globulinas presentes nos embriões e as prolaminas que se encontram exclusivamente no endosperma dos cereais (Shotwell e Larkins, 1988; Hernan e Larkins, 1999). Na análise das sementes de *V. reitzii* por MET foram encontradas grandes concentrações de lipídeos e proteínas em forma de reserva nas células do embrião.



**Figura 6.** Seções transversais de sementes de *Vriesea reitzii* em microscopia de transmissão. Se observam: a) estrutura de células do embrião de sementes não criopreservadas, corpos protéicos (setas), a parede celular, núcleo e corpos lipídicos (cabeça de seta); b) detalhe de corpos protéicos (seta) e corpo lipídico (cabeça de seta); c) detalhe do núcleo das células, e corpos lipídicos (cabeça de seta); d) estrutura de células do embrião de sementes criopreservadas, corpos lipídicos (seta) e corpos protéicos; e) detalhe do núcleo das células, membrana do núcleo em estado normal sem sofrer danos causados pelo processo criogênico; f) detalhe de corpos protéicos e corpos lipídicos (seta), se observa estado intato das membranas das organelas. ei, espaço intercelular; N, núcleo; pc, parede celular.

## 6 CONCLUSÕES

As sementes de *V. reitzii* apresentam um processo de dessecação natural em relação ao período de permanência dos frutos nas plantas.

As sementes de *V. reitzii*, podem ser classificadas como sementes ortodoxas, de acordo com a capacidade de suportar o armazenamento e conteúdo de água em relação ao período de coleta dos frutos.

O período de coleta, em dias após a antese, revelou ser um fator importante em relação a capacidade de germinação e ao índice de velocidade de germinação das sementes.

O processo de criopreservação de imersão direta não causou danos estruturais nas sementes, independente do período de coleta. e podem ser submetidas a um processo de criopreservação simplificado, sem serem afetadas estrutural ou bioquimicamente.

As sementes não apresentaram diferenças no conteúdo de carboidratos solúveis totais aos 120, 135 e 150 dias após a antese.

Análises anatômicas (óptica e por transmissão) permitiram a caracterização das estruturas celulares e a verificação da estabilidade estrutural das células, após o processo criogênico.



## 7REFERÊNCIAS

- Aguilar, M.E.; Engelmann, F.; Michaux-Ferrière, N. 1993. Cryopreservation of embryogenic cell suspensions of *Citrus deliciosa* Tan. and histological study. *CryoLetters*, 14:217-228.
- Almeida, Francisco de A. C., Morais, Ailton M. de, Carvalho, Julita M. F. C., & Gouveia, Josivanda P. G. de. (2002). Crioconservação de sementes de mamona das variedades nordestina e pernambucana. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 6(2), 295-302. <https://dx.doi.org/10.1590/S1415-43662002000200019>
- Alves, G.M.; Guerra, M.P. 2001. Micropropagation for mass propagation and conservation of *Vrieseafriburgensis* var. *paludosa* from microbuds. *Journal of the Bromeliad Society*, 51(5): 202- 212
- Alves, G.M.; Dal Vesco, L.L.; Guerra, M.P. 2006. Micropropagation of the Brazilian endemic bromeliad *Vriesea reitzii* through nodule clusters culture. *ScientiaHorticulturae*, 110:204-207
- Akaike, H. (1983). Information measures and model selection. *International Statistical Institute*, 44, 277-291.
- Akaike, H. (1987) Factor analysis and AIC. *Psychometrika*, 52, 3, 317-332.
- Barbedo, C. J., & Marcos Filho, J. (1998). TOLERÂNCIA À DESSECAÇÃO EM SEMENTES, 12(2), 145–164. Retrieved from <http://www.scielo.br/pdf/abb/v12n2/v12n2a05>
- Benzing, D.H., 1980. *The Biology of the Bromeliads*. Eureka, California
- Benzing, D. H. *Bromeliaceae: Profile of an adaptive radiation*. New York: Cambridge University Press, p. 690, 2000.
- Blackman, S. A., Obendorf, R.L. & Leopold, A.C. 1992. Maturation proteins and sugars in desiccation tolerance of developing soybean seeds. - *Plant Physiol*. 100: 225-230
- Blakesley, D.; Pask, N.; Henshaw, G.G.; Fay, M.F. 1996. Biotechnology and the conservation of forest genetic resources: In vitro strategies and cryopreservation. *Plant Growth Regul.* 20:11-16
- BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. *Biochemistry & molecular biology of plants*. Maryland: American Society of Plant Physiologists, 2000.

Buckeridge, M.D., Aidar, M.P.M., Santos, H.P. & Tiné, M.A.S. 2004. Acúmulo de reservas. In: A. G. Ferreira & F. Borghetti (eds.). *Germinação: do básico ao aplicado*. Porto Alegre, Artmed, pp. 31-50

Caetano, G. de S. S. (2012). Higoscopicidade E Criopreservação De Sementes De Caju-De-Árvore-Do-Cerrado. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano. Retrieved from [https://sistemas.ifgoiano.edu.br/sgcursos/uploads/anexos\\_5/2017-11-30-12-57-21Graciene de Souza Santos Caetano.pdf](https://sistemas.ifgoiano.edu.br/sgcursos/uploads/anexos_5/2017-11-30-12-57-21Graciene de Souza Santos Caetano.pdf)

Carranza-Quiceno, J. A., & Estévez-Varón, J. V. (2008). Ecología De La Polinización De Bromeliaceae En El Dosel De Los Bosques Neotropicales De Montaña\*. *Boletín Científico Museo De Historia Natural*, 12, 38–47. Retrieved from <http://www.scielo.org.co/pdf/bccm/v12n1/v12n1a03.pdf>

Centro Nacional Recursos Genéticos, Embrapa, Brazil. <http://www.cenargen.embrapa.br>. Cited 8 Jan 2018; 2010

Chen. Y. & Burris. J. S. 1990. Rolc 01' carbohydrates in desiccation tolerance and membranc behaviour in maluring maize seed. *Crop Science* 30: 971-975.

Coffani Nunes J.V. 2002. Bromélias. Em: Simões L.L. e Lino C.F. (Eds), *Sustentável Mata Atlântica: A exploração de seus recursos florestais*. São Paulo, SENAC, p. 119-132

Corredor-prado, J. P., Schmidt, E. C., Guerra, M. P., Bouzon, Z. L., Dal, L. L., & Pescador, R. (2015). Histodifferentiation and ultrastructure of nodular cultures from seeds of *Vriesea friburgensis* Mez var. *paludosa* (L.B. Smith) L.B. Smith and leaf explants of *Vriesea reitzii* Leme & A. Costa (Bromeliaceae). *Journal of Microscopy and Ultrastructure*, 3, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.jmau.2015.04.001>

Corredor-Prado, J., Schmidt, E., Steinmacher, D., Guerra, M., Bouzon, Z. L., Dal Vesco, L., & Pescador, R. (2014). Seed morphology of *Vriesea friburgensis* var . *paludosa*. *Hoehnea*, 41(4), 553–562. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1590/2236-8906-08/2013>

Corredor, J. P. (2012). *Caracterização Morfo-Histoquímica Da Germinação E O Desenvolvimento Pós-Seminal In Vitro E Formação De Culturas Nodulares Em Florianópolis Catalogação na fonte pela biblioteca da Universidade Federal de Santa Catarina. Dissertação (Mestrado)*. Universidade Federal de Santa Catarina.

- Costa, A. F. da, Luther, H. E., & Wanderley, M. D. G. L. (2004). A new species of *Vriesea* (Bromeliaceae) from the atlantic forest, Brasil. *Novon*, 14(1), 36–39.
- Dal Vesco, L.L.; Guerra, M.P. 2010. In vitro morphogenesis and adventitious shoot mass regeneration of *Vriesea reitzii* from nodular cultures. *Scientia Hort.* 125:748-755
- Dal Vesco, L.L.; Stefenon, V.M.; Welter, L.J.; Scherer, R.F.; Guerra, M.P. 2011. Induction and scale-up of *Bilbergia zebrina* nodule cluster cultures: implications for mass propagation, improvement and conservation. *Scientia Horticulturae*, 128:515-522
- Dal Vesco, L.L.; Pescador, R.; Corredor Prado, J.P.; Welter, L.J.; Guerra, M.P. 2014a. In vitro propagation of *Vriesea reitzii*, a native epiphyte bromeliad from the Atlantic rainforest. *Acta Sci Biol Sci*, 36(3):271-8. doi:10.4025/actascibiolsci.v36i3.21006
- Dal Vesco, L.L.; Vieira, P.; Corredor Prado, J.P.; Pescador, R.; Welter, L.J.; Guerra, M.P. 2014b. Induction and development of nodular cluster cultures in *Vriesea reitzii* (Leme and Costa), and endangered bromeliad from the Brazilian Atlantic Forest. *J Hortic Sci Biotechnol*, 89(5):542-48
- Dubois, M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K.; Rebers, P.A.; Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28:350-356
- Engelmann, F. 2003. Plant cryopreservation: current status, prospects and limitations. In Mandal, BB; Chaudhury, F; Engelmann, F; Bahag Mal Tao, KL; Dhillon, BS. eds. *Conservation biotechnology of plant germplasm*. Nueva Delhi, IN, NBPGR; Roma, IT, IPGRI; Roma, IT; FAO. p. 223-228.
- Engelmann, F. 2004. Plant cryopreservation: progress and prospect. . In *vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 40:427-433.
- Engelmann, F.; Takagai, H. 2000. Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application. Tsukuba, JP, Japan International Research Center for Agricultural Sciences; Roma, IT, IPGRI.
- Engelmann, F. 2011. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 47:5-16
- ENGELMANN, F., DUSSERT, S. Current development of

cryopreservation for the conservation of plant genetic resources. *Cahiers Agricultures*, n. 9, p. 237-245, 2000.

Frank, J.H.; Lounibos, L.P. 2009. Insects and allies associated with bromeliads: a review. *Terrestrial Arthropod Reviews* 1(2):125-153

Galerie, M.; Bercetche, J.; Dereuddre, J. 1992. Cryoconservation of embryogenic cellus of Norway spruce (*Picea abies* L. Karst)—Influence of different factors on callus recovery and on embryos and plantlet production. *Bull. Soc. Fr. Lett. Bot.* 4–5: 331-344

Galindo-Leal C.; Câmara I. G. 2005. Status do hotspot Mata Atlântica: uma síntese Em: *Mata Atlântica: biodiversidade, ameaças e perspectivas*. Eds. Galindo-Leal C. e Câmara I. G. São Paulo: Fundação SOS Mata Atlântica - Belo Horizonte: Conservação Internacional.

Gomes-da-Silva, J., & Souza-Chies, T. T. (2017). What actually is *Vriesea*? A total evidence approach in a polyphyletic genus of Tillandsioideae (Bromeliaceae, Poales). *Cladistics*, 1–19. <https://doi.org/10.1111/cla.12200>

Gonzalez-Arno, MT; Panta, A; Roca, WM; Escobar, RH; 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

González-Arno, M.T.; Engelmann, F. 2013. Crioconservación de plantas en América Latina y el Caribe. San José: IICA, 204p.

Helliot, B., Swennen, R., Poumay, Y., Frison, E., Lepoivre, P., & Panis, B. (2003). Ultrastructural changes associated with cryopreservation of banana (*Musa* spp.) highly proliferating meristems. *PlantCellReports*, 21(7), 690–698. <https://doi.org/10.1007/s00299-002-0537-x>

Herman, E.M., and Larkins, B.A. (1999). Protein storage bodies and vacuoles. *Plant Cell* 11, 601–613.

Hornung-Leoni, C. T. (2011). Avances sobre Usos Etnobotánicos de las Bromeliaceae en Latinoamérica. *Plantas Medicinales Y Aromáticas*, 10(4), 297–314. Retrieved from [www.blacpma.usach.cl](http://www.blacpma.usach.cl)

Kessous, I. M., Couto, D. R., Uribbe, F. P., & Costa, A. F. da. (2018). New records of *Vriesea agostiniana* E.Pereira, and *Vriesea saltensis* Leme & L.Kollmann (Bromeliaceae, Tillandsioideae) from southeastern Brazil. *Check List* 14(1), (January), 37–41. <https://doi.org/10.15560/14.1.37>

- Kulus, D.; Zalewska, M. 2014. Cryopreservation as a tool used in long-term storage of ornamental species – A review. *Scientia Hort*, 168:88-107
- Leme, E. M. C., & Ludovic, J. C. K. (2011). PHYTOTAXA New species and a new combination of Brazilian Bromeliaceae. *Phytotaxa*, 16, 1–36. Retrieved from [www.mapress.com/phytotaxa/](http://www.mapress.com/phytotaxa/)
- LUTHER, H.E. An alphabetic list of Bromeliad Binomials. The Marie Selby Botanical Gardens. 11a Ed. Sarasota, Florida: Bromeliad Society International, 114p, 2008
- MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Science*, 2 (2):176-177, 1962.
- Martinelli, G.; Vieira, C.M.; Gonzalez, M.; Leitman, P.; Piratinga, A.; Ferreira Da Costa, A.; Forzza, R.C. 2008. Bromeliaceae da mata atlântica brasileira: lista de espécies, distribuição e conservação. *Rodriguésia*, 59 (1):209-258
- Martins, L., Augusto Lago, A. DO, Carlos Silva Andrade, A. DE, & Roberto Marques Sales, W. (2009). CONSERVAÇÃO DE SEMENTES DE IPÊ-ROXO (*Tabebuia impetiginosa*). *Revista Brasileira de Sementes*, 31(2), 71–76. Retrieved from <http://www.scielo.br/pdf/rbs/v31n2/v31n2a08>
- MARZALINA, M.; KRISHNAPILLAY, B. Recalcitrant seed Biotechnology applications to rain forest conservation. In: BENSON, E. E. (Ed.) – *Plant Conservation Biotechnology*, London: Taylor and Francis Ltd., 1999. p. 265-276
- Meryman, H.T.; Williams, R.J. 1985. Basic principles of freezing injury to plant cells: natural tolerance and approaches to cryopreservation. In Kartha, KK. ed. *Cryopreservation of plant cells and organs*. Boca Raton: CRC Press. p. 13-14.
- MELLO, J. I. D. O. (2013). Alterações bioquímicas durante o armazenamento e a germinação de sementes de *Caesalpinia echinata* e *Erythrina speciosa*, leguminosas nativas da Floresta Atlântica. - Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente. Retrieved from [http://www.biodiversidade.pgibt.ibot.sp.gov.br/web/teses/2013/pdf/juliana\\_iura\\_de\\_oliveira\\_mello\\_dr.pdf](http://www.biodiversidade.pgibt.ibot.sp.gov.br/web/teses/2013/pdf/juliana_iura_de_oliveira_mello_dr.pdf)
- Morales, J. F. (2014). Seis Nuevas Especies de *Vriesea* sect . *Xiphion* ( Bromeliaceae : Tillandsioideae ) para Costa Rica, 9(3), 401–406.

Mollo, L., Martins, M. C. M., Oliveira, V. F., Nievola, C. C., & Figueiredo-Ribeiro, R. de C. L. (2011). Effects of low temperature on growth and non-structural carbohydrates of the imperial bromeliad *Alcantarea imperialis* cultured in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 107(1), 141–149. <https://doi.org/10.1007/s11240-011-9966-y>

MOTTA LEDUC, S. N. (2007). *Indução de Tolerância à Dessecação e Variações de Carboidratos Solúveis em Sementes de Caesalpinia echinata Lam. (Pau-Brasil) durante a Maturação*. Instituto de Botânica. Retrieved from [http://www.biodiversidade.pgibt.ibot.sp.gov.br/web/teses/2007/pdf/simone\\_nadur\\_motta\\_leduc\\_ms.pdf](http://www.biodiversidade.pgibt.ibot.sp.gov.br/web/teses/2007/pdf/simone_nadur_motta_leduc_ms.pdf)

MOREL, G. M. and WETMORE, R. H. (1951). Tissue culture of monocotyledons. *American Journal of Botany*, 38, 138–140

Moraes, A. M. de. (2007). *Técnicas De Micropropagação E Criopreservação Para Abacaxizeiro*. Universidade Federal de Paraíba. UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA CENTRO.

Moura, E. F., Ventrella, M. C., & Yoshimitsu Motoike, S. (2010). Structure of seed and somatic embryo of *A. aculeata* Anatomy, histochemistry and ultrastructure of seed and somatic embryo of *Acrocomia aculeata* (Arecaceae). *Sci. Agric. (Piracicaba)*, 67(4), 399–407. Retrieved from <http://www.scielo.br/pdf/sa/v67n4/v67n4a04.pdf>

Myers, N.; Mittermeier, R. A.; Fonseca, G. A. B.; Kent, J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403:853-858

Murashige, T.; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15:473-497

ONU (Organización de las Naciones Unidas, US). 1992. Convención sobre la Diversidad Biológica (en línea). In Conferencia de las Naciones Unidas sobre el Medio Ambiente y el Desarrollo (1992, Río de Janeiro, BR). Consultado 18 mar. 2012. Disponible en <http://www.cbd.int/doc/legal/cbdes.pdf>

Pereira, A.R.; Pereira, T.S.; Rodrigues, A.S.; Andrade, A.C.S. de. 2008. Morfologia de sementes e do desenvolvimento pós-seminal de espécies de Bromeliaceae. *Acta Botânica Brasilica*, 22(4):1150-1162

PEREIRA, C. (2009). *Ponto De Colheita De Frutos, Qualidade E Armazenamento De Sementes De Nidularium innocentii (Lem.) E Nidularium procerum (Lindm)*. Universidade Federal do Paraná.

- 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 Sci. & Technol*, 38:79-87
- Pico-v, A. (2016). Conservación ex situ de *Puya loca* Madriñan (Bromeliaceae) y registro de una segunda localidad en los páramos de Colombia, *40*(157), 637–643.
- Pico, A. (2016). Fenología y brotación vegetativa de una nueva especie de *Vriesea* (Bromeliaceae) de Colombia en condiciones ex situ. *Rev. Acad. Colomb. Cienc. Ex. Fis. Nat*, *40*(156), 494–499. <https://doi.org/10.18257/raccefyn.375>
- Pilatti, F.K.; Aguiar, T.; Simões, T.; Benson, E.E.; Viana, A.M. 2011. In vitro and cryogenic preservation of plant biodiversity in Brazil. *In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, *47*: 82-98
- PUESCHEL, C. M. Ultrastructure of tetrasporogenesis in *plamaria palmata* (rhodophyta). *Jornal phycology*, 1979. v. 15, p. 409–424.
- Pulido-Rueda, E. E., Milaneze-Gutierrez, M. A., & Negrelle, R. (2018). In vitro germination and growth of *Vriesea incurvata* Gaudich. (Bromeliaceae), *67*, 140–145.
- R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2011. ISBN 3-900051-07-0.
- RechFilho, A.; Dal Vesco L.L.; Guerra, M.P. 2009. Adventitious shoots from nodule cluster cultures of *Vriesea reitzii*: an endemic and endangered bromeliad from Atlantic Forest. *Ciência Rural*, *39*(3):909-912. Doi: 10.1590/S0103-84782008005000088
- Reed, B.M. 2008. *Plant cryopreservation: a practical guide*. Springer Science. 513 p.
- Reitz, R. 1983. Bromeliáceas e a malária - bromélia endêmica. (Flora ilustrada Catarinense série 983) Itajai: Herbário Barbosa Rodrigues, 559 p.
- REYNOLDS, E. S. The use of lead citrate at high ph as an electron-opaque stain in electron microscopy. *The journal of cell biology*, 1 abr. 1963. v. 17, n. 1, p. 208–212.
- Rocha, C. F. D.; Cogliatti-Carvalho, L.; Almeida, D. R.; Freitas, A. F. N. 1997. Bromélias: ampliadoras da biodiversidade. *Bromélia* *4*(4):7-11

Rocha, M. do S. Crioconservação e cultivo in vitro de sementes de algodão colorido. Campina Grande: UFCG, 2004. 112p. Dissertação Mestrado

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

Rowntree, J. K., Duckett, J. G., Mortimer, C. L., Ramsay, M. M., & Pressel, S. (2007). Formation of Specialized Propagules Resistant to Desiccation and Cryopreservation in the Threatened Moss *Ditrichum plumbicola* (Ditrichales, Bryopsida). *Annals of Botany*, 100(3), 483–496. <http://doi.org/10.1093/aob/mcm141>

SANTOS, I. R. I. Criopreservação de germoplasma vegetal. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, Brasília, v. 4, n. 20, p. 60-65, maio/jun. 2001

Sakai, A. 1995. Cryopresevation for germplasm collection in woody plants. In Jain, S; Gupta, P; Newton, R. eds. *Somatic embryogenesis in woody plants vol. 1*. Dordrecht, NL, Kluwer Academics Publishers. p. 293-315.

Scherer, R.F.; Garcia A.C.; Fraga H.P.; Dal Vesco, L.L.; Steinmacher D.A.; Guerra M.P. 2013. Nodule cluster cultures and temporary immersion bioreactors as a high performance micropropagation strategy in pineapple (*Ananas comosus* var. *comosus*). *Scientia Horticulturae*, 151:38-45

Shotwell, M.A., and Larkins, B.A. (1988). The biochemistry and molecular biology of seed storage proteins. In *The Biochemistry of Plants*, B.J. Mifflin, ed (New York: Academic Press), pp. 297–345.

Smith, L. B.; Downs, R. J. Pitcairnioidea (Bromeliaceae). *Flora Neotropica Monograph No. 14, Part . 1*. New York: OFN-Halfner Press, 658 p, 1974.

SMITH, L. B. & DOWNS, R. J. Bromelioideae (Bromeliaceae). *Flora Neotropica* v.14, n.3, p. 1493-2141, 1979.

Souza, V.; Lorenzi, H. 2005. *Botânica Sistemática – guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II*. Nova Odessa: Instituto Plantarum

SOUZA, L. A.; PAOLI A. A. S. Estrutura da semente. Em: *Sementes e*

plântulas: germinação, estrutura e adaptação. SOUZA, L. A. Ponta Grossa, PR: Todapalavra, 2009.

Souza, P. F. de. (2012). SELEÇÃO E PROPAGAÇÃO DE DUAS ESPÉCIES DO GÊNERO HYMENAEA. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

Souza, P. F. De, Santana, R. C., Sebastião, J., Fernandes, C., Felipe, L., Oliveira, R. De, ... Nery, M. C. (2015). Germinação e Crescimento Inicial Entre Matrizes de Duas Espécies do Gênero Hymenaea. *Floresta E Ambiente*, 22(4), 532–540.

Spurr AR. A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J Ultra Res* 1969;26:31–43.

STANWOOD, P. C. Cryopreservation of seed germplasm for genetic conservation. In: *Cryopreservation of Plant Cells and Organs*: Ed. K. Kartha. 1985. p.199- 225

Stehmann, J.R; Forzza, R.C.; Sobral, M.; Salino, A.; Kamino, L.H.Y. (eds.) 2009. *Plantas da Floresta Atlântica*. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 516p.

Stushnoff C, Seufferheld M (1995) Cryopreservation of Apple (*Malus* species) Genetic Resources. In YPS Bajaj, ed, *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol. 32, *Cryopreservation of Plant Germplasm I*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, pp 87-101

Sun, W. Q., Irving, T. C., & Leopold, A. C. (1994). The role of sugar, vitrification and membrane phase transition in seed desiccation tolerance. *Physiologia Plantarum*, 90(4), 621–628. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1994.tb02516.x>

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 Brasílica* 21: 777–783

Uemura, M.; Minami, A.; Kawamura, Y. 2009. Effect of low temperature and cryoprotectants on plant plasma membrane. In: 1st International Symposium: Cryopreservation in Horticultural Species, Book of Abstracts. ISHS, Leuven, pp. 15.

Ventrella, M. C., Almeida, A. L., Nery, L. A., & Coelho, V. peçanha de

M. (2013). Métodos histoquímicos aplicados às sementes. Universidade Federal de Viçosa

VERSIEUX, L. M. (2008). Checklist and one new species of Bromeliaceae from Pico do Itambé, Minas Gerais, Brazil. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 158(4), 709–715. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2008.00895.x>

Villalobos, V.M.; Engelmann, F. 1995. Ex situ conservation of plant germoplasm using biotechnology. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 11:375-380

Zanotti, R. F., Motta, L. B., Bragatto, J., Labate, C. A., Salomão, A. N., Vendrame, W. A., & Cuzzuol, G. R. F. (2012). Germination, carbohydrate composition and vigor of cryopreserved *Caesalpinia echinata* seeds. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 55(5), 661–669. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132012000500004>

ZOTZ, G. & HIETZ, P., 2001.- The physiological ecology of vascular epiphytes: current knowledge, open questions. *Journal of experimental botany*, 52 (354): 2067-2078.

Wanderley, M.G.L.; Martins, S.E. 2007. Bromeliaceae. In: Wanderley, M.G.L.; Shepherd, G.J.; Melhem, T.S.; Giulietti, A.M. (eds.). *Flora fanerogâmica do estado de São Paulo*. Instituto de Botânica, São Paulo. p. 39-161

## ANEXOS

**Anexo 1:** Resumo da Anova referente a conteúdos em base úmida % de sementes de *V. reitzii*.

<i>FV</i>	<i>SQ</i>	<i>GL</i>	<i>QM</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F Critico</i>	
Dias após a antese	25,411	2	12,705	10,105	0,005	4,256	**
Resíduo.	11,316	9	1,257				
Total	36,726	11					

Códigos de significância: '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05

**Anexo 2:** Resumo da ANOVA referente aos efeitos das interações entre criopreservação e dias após colheita sob a germinação de sementes de *V. reitzii*.

<i>FV</i>	<i>SQ</i>	<i>GL</i>	<i>QM</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F Critico</i>	
Criopreservação	1,85	1	1,85	0,035	0,85386NS	4,413873419	
DAA	1601,00	2	800,50	15,079	0,00014***	3,554557146	
Interação	62,03	2	31,02	0,584	0,56775NS	3,554557146	
Resíduo.	955,56	18	53,09				
Total	2620,45	23					

Códigos de significância: '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05

**Anexo 3:** Resumo da ANOVA referente ao efeito dos DAA sobre a germinação total das sementes de *Vriesea reitzii*.

<i>FV</i>	<i>SQ</i>	<i>GL</i>	<i>QM</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	
DAA	1601,00	2	800,50	16,49	4,953E-05	***
Resíduo	1019,45	21	48,55			
Total	2620,45	23				

Códigos de significância: '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05

**Anexo 4:** resumo da ANOVA do IVG em função a criopreservação e ao DAA

<i>FV</i>	<i>SQ</i>	<i>GL</i>	<i>QM</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F Critico</i>
Criopreservação	0,007	1	0,007	0,002	0,967	4,414
DAA	49,000	2	24,500	6,261	0,009	3,555 **
Interação	0,194	2	0,097	0,025	0,975	3,555
Resíduo	70,438	18	3,913			
Total	119,639	23				

Códigos de significância: '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05

**Anexo 5:** Resumo da ANOVA referente a IVG, em sementes de *V. reitzii* em função ao DAA

<i>FV</i>	<i>SQ</i>	<i>GL</i>	<i>QM</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F Critico</i>
DAA	49,000	2	24,500	7,283	0,004	3,467 **
Resíduo	70,639	21	3,364			
Total	119,639	23				

Códigos de significância: '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05

**Anexo 6.** Resumo da ANOVA referente ao conteúdo de carboidratos totais em sementes de *V. reitzii*

<i>FV</i>	<i>SQ</i>	<i>GL</i>	<i>QM</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F Critico</i>
Criopreservação	0,004	1	0,004	0,263	0,617	4,747
DAA	0,032	2	0,016	1,026	0,388	3,885
Interação	0,002	2	0,001	0,069	0,934	3,885
Resíduo	0,187	12	0,016			
Total	0,226	17				

Códigos de significância: '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05