



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

JEAN CARLO BAUDRAZ DE PAULA

**CRIOPRESERVAÇÃO EM NITROGÊNIO LÍQUIDO DE  
SEMENTES DE DYCKIAS (BROMELIACEAE) NATIVAS DO  
BRASIL**

---

Londrina  
2019

JEAN CARLO BAUDRAZ DE PAULA

**CRIOPRESERVAÇÃO EM NITROGÊNIO LÍQUIDO DE  
SEMENTES DE DYCKIAS (BROMELIACEAE) NATIVAS DO  
BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Tadeu de Faria

Londrina  
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Baudraz de Paula, Jean Carlo.

CRIOPRESERVAÇÃO EM NITROGÊNIO LÍQUIDO DE SEMENTES DE DYCKIAS (BROMELIACEAE) NATIVAS DO BRASIL / Jean Carlo Baudraz de Paula. - Londrina, 2019.

67 f. : il.

Orientador: Ricardo Tadeu de Faria.

Coorientador: Roberto Jun Takane.

Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2019.

Inclui bibliografia.

1. Conservação - Tese. 2. Crioprotetores - Tese. 3. Vitrificação - Tese. I. de Faria, Ricardo Tadeu. II. Jun Takane, Roberto. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. IV. Título.

JEAN CARLO BAUDRAZ DE PAULA

**CRIOPRESERVAÇÃO EM NITROGÊNIO LÍQUIDO DE SEMENTES  
DE DYCKIAS (BROMELIACEAE) NATIVAS DO BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Agronomia.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Ricardo Tadeu de Faria  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Profa. Dra. Christina da Silva Wanderley  
Universidade Filadelfia - Unifil

---

Dra. Mauren Sorace  
Universidade Estadual de Maringá - UEM

Londrina, 14 de Fevereiro de 2019.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado saúde e força para superar as dificuldades, aos meus pais Denilson e Matilde, pois sem eles eu não chegaria até aqui, através de seus ensinamentos, amor, incentivo e apoio incondicional. Vocês foram essenciais para minha formação. Agradeço também as minhas irmãs Larissa e Letícia, meus tios e em especial meus avôs, João (in memória), Iraci, Louis e Nair, por serem minha base e terem feito parte desta trajetória.

A minha namorada Ana Carolina, que me apoiou, soube compreender quando eu não podia estar presente, me incentivou e esteve comigo para superar todas as dificuldades. Obrigado por ter permitido que eu não desistisse dessa jornada.

Ao meu orientador Professor Dr. Ricardo Tadeu de Faria, pelo empenho e parceria na elaboração deste trabalho. A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Agronomia, em especial a Professora Dr<sup>a</sup>. Lúcia Sadayo Assari Takahashi, pelo esforço e dedicação dentro de sala de aula.

À Universidade Estadual de Londrina, seu corpo docente, direção e administração que oportunizaram a janela que hoje vislumbro, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, pelo acolhimento e interesse demonstrado na execução e conclusão deste trabalho. Ao CNPQ pelo suporte financeiro através da concessão da bolsa.

Aos meus amigos de laboratório Gianne, Gabriel, Renata, Isadora e Oswaldo, cujo apoio e amizade estiveram presentes em todos os momentos. E a todos os demais colegas de laboratório que se fizeram presentes nesta caminhada.

Ao Dr. Walter Miguel Kranz, talvez não existam palavras suficientes e significativas que me permitam agradecer com o devido merecimento, por uma demonstração de humildade ao transmitir seus conhecimentos e fornecimento dos principais materiais necessários para que este trabalho fosse realizado, sem você este não se tornaria possível.

E a todos aqueles que não foram citados, mas que direta ou indiretamente contribuíram e tornaram possível a conclusão deste trabalho, o meu muito obrigado.

“Continue fazendo a sua parte para realizar seus sonhos. Aprendi que nem todas as sementes plantadas vingam, mas quando germinam quase todas dão flor. É sempre um misto de sorte, destino, solo fértil, água, sol e amor. Siga o seu plantio. A vida dirá a hora certa de colher.”

Matheus Rocha

DE PAULA, Jean Carlo Baudraz. **Criopreservação em nitrogênio líquido de sementes de Dyckias (Bromeliaceae) nativas do Brasil.** 2019. 67f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

## RESUMO

As bromélias desempenham papel fundamental na biodiversidade dos ecossistemas além de sua importância econômica, uso ornamental e farmacêutico. Devido principalmente ao extrativismo, queimadas e desmatamento, diversas espécies estão em risco de extinção. Entre estas espécies estão *Dyckia brevifolia* e *Dyckia delicata*, consideradas ameaçadas devido ao desequilíbrio e destruição de seu habitat, sendo fundamental uma técnica de preservação destes materiais. A criopreservação é um processo de preservação em que o material biológico é submetido a temperaturas extremamente baixas utilizando nitrogênio líquido (-196°C). Para que se tenha bons resultados durante a fase de congelamento, é necessária a adição de substâncias crioprotetoras. O trabalho teve como objetivo avaliar a influência de diferentes soluções crioprotetoras na criopreservação em nitrogênio líquido de sementes das espécies de bromélias brasileiras ameaçadas de extinção *D. brevifolia* e *D. delicata*. O experimento foi realizado com sementes das espécies citadas utilizando dez tratamentos e quatro repetições por tratamento, sendo estes: sem adição de solução crioprotetora e sem imersão em nitrogênio líquido; imersão em nitrogênio líquido sem adição de crioprotetor; glicerol 1M; glicerol 2M; sacarose 0,4M; sacarose 0,8M; PVS1; PVS2; PVS2 + 1% floroglucinol e PVS3. As sementes permaneceram congeladas em nitrogênio líquido por 15 dias e posteriormente foram descongeladas e colocadas para germinar em câmara de crescimento. Durante a germinação foi avaliado o índice de velocidade de germinação e ao décimo dia foram avaliados o percentual de germinação e de plântulas anormais, além do comprimento de plântulas e determinação de massa seca. Seis meses após o plantio das mudas foram avaliados o comprimento da parte aérea e do sistema radicular, além da determinação de massa seca da parte aérea e radicular. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado e os dados obtidos foram submetidos à análise de variância ( $p < 0,05$ ). Os dados foram processados utilizando o software R, e submetidos ao teste de Tukey a 5% de probabilidade. Na avaliação das plântulas e das mudas, não houve diferença entre a utilização ou não de solução crioprotetora durante a criopreservação. Para as espécies a porcentagem de germinação após a criopreservação variou de 79 a 94%. Para o tratamento sem o uso de crioprotetores, as sementes de *D. brevifolia* e *D. delicata* apresentaram, respectivamente, 92% e 79% de porcentagem de germinação. O uso de crioprotetores não prejudicou a viabilidade das sementes. Sementes de *Dyckia brevifolia* com 6,8% de teor de água e *Dyckia delicata* com 8,9% podem ser criopreservadas em nitrogênio líquido sem a necessidade de soluções crioprotetoras.

**Palavras-chave:** Conservação. Crioprotetores. Vitrificação.

DE PAULA, Jean Carlo Baudraz. **Cryopreservation in liquid nitrogen of seeds of Dyckias (Bromeliaceae) native to Brazil.** 2019. 67p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

## ABSTRACT

Bromeliads play a key role in the biodiversity of ecosystems beyond their economic importance, ornamental and pharmaceutical use. Due mainly to the extractivism, burning and deforestation, several species are in danger of extinction. Among these species are *Dyckia brevifolia* and *Dyckia delicata*, considered threatened due to imbalance and destruction of their habitat, being a fundamental technique in the preservation of these materials. Cryopreservation is a preservation process in which biological material is subjected to extremely low temperatures using liquid nitrogen (-196 ° C). In order to achieve good results during the freezing phase, the addition of cryoprotective substances is necessary. This work aimed to evaluate the influence of different cryoprotectant solutions on liquid nitrogen cryopreservation of seeds of endangered Brazilian bromeliads *D. brevifolia* and *D. delicata*. The experiment was carried out with seeds of the mentioned species using ten treatments and four replicates per treatment, as follow: without addition of cryoprotectant solution and without immersion in liquid nitrogen; immersion in liquid nitrogen without addition of cryoprotectant; 1M glycerol; 2M glycerol; 0.4M sucrose; 0.8M sucrose; PVS1; PVS2; PVS2 + 1% floroglucinol and PVS3. The seeds remained frozen in liquid nitrogen for 15 days and were later thawed and placed to germinate in a growth chamber. During the germination the germination speed index was evaluated and at the 10th day the germination percentage and abnormal seedlings were evaluated, as well as seedling length and dry mass determination. Six months after planting the seedlings, the length of the aerial part and the root system were evaluated, besides the determination of aerial part and root dry mass. The experimental design was completely randomized and obtained data were submitted to analysis of variance ( $p < 0.05$ ). Data were processed using software R and submitted to the Tukey test at 5% probability. In the evaluation of seedlings and plantlets, there was no difference between the use or not of cryoprotectant solution during cryopreservation. For the species the percentage of germination after cryopreservation ranged from 79 to 94%. For the treatment without the use of cryoprotectants, *D. brevifolia* and *D. delicata* seeds presented, respectively, 92% and 79% of germination percentage. The use of cryoprotectants did not affect the viability of the seeds. *Dyckia brevifolia* seeds with 6.8% water content and *Dyckia delicata* seeds with 8.9% may be cryopreserved in liquid nitrogen without cryoprotective solutions.

**Key words:** Conservation. Cryoprotectants. Vitrification.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 2.1.1 -</b>	Distribuição geográfica da família Bromeliaceae .....	12
<b>Figura 2.2.1 -</b>	Distribuição de espécies da família Bromeliaceae por bioma brasileiro .....	16
<b>Figura 2.3.1 -</b>	Área de ocorrência do gênero <i>Dyckia</i> Schult. & Schult.f.....	17
<b>Figura 2.3.1.1 -</b>	<i>Dyckia brevifolia</i> Baker. registrada em seu habitat.....	20
<b>Figura 2.3.1.2 -</b>	Visão geral da roseta de <i>Dyckia brevifolia</i> Baker .....	20
<b>Figura 2.3.2.1 -</b>	Mapa de Ocorrência de <i>Dyckia delicata</i> Larocca & Sobral.....	21
<b>Figura 2.3.2.2 -</b>	<i>Dyckia delicata</i> Larocca & Sobral. representada em (A) Espécime in habitat (B) Inflorescência.....	22
<b>Figura 2.9.1.1 -</b>	Eventos físico-químicos que ocorrem durante o método de congelamento lento.....	31
<b>Figura 2.9.1.2 -</b>	Desenho esquemático que ilustra a sequência de etapas dos procedimentos para o congelamento lento no processo de criopreservação.....	32
<b>Figura 2.9.2.1 -</b>	Desenho esquemático que ilustra a sequência de etapas dos procedimentos para o congelamento rápido no processo de criopreservação.....	34
<b>Figura 3.4.1 -</b>	Detalhe da planta (A), inflorescência (B) e sementes (C) de <i>Dyckia brevifolia</i> .....	40
<b>Figura 3.4.2 -</b>	Detalhe da planta (A), inflorescência (B) e sementes (C) de <i>Dyckia brevifolia</i> .....	40
<b>Figura 3.5.1 -</b>	Sementes de <i>Dyckia brevifolia</i> (A) e <i>Dyckia delicata</i> (B) submetidas ao teste de tetrazólio antes da criopreservação em nitrogênio líquido .....	43
<b>Figura 3.5.2 -</b>	Plântulas de <i>Dyckia brevifolia</i> (A) e <i>Dyckia delicata</i> (B) após 30 dias em câmara de germinação.....	47
<b>Figura 3.5.3 -</b>	Desenvolvimento de plantas de <i>Dyckia brevifolia</i> (A) e <i>Dyckia delicata</i> (B) após 180 dias submetidos (+NL) ou não (-NL) ao processo de criopreservação em nitrogênio líquido .....	50

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 3.5.1 -</b>	Porcentagem de germinação (GERM) e plântulas anormais (PA), índice de velocidade de germinação (IVG), comprimento (CP) e massa seca de plântulas (MSP) de <i>D. brevifolia</i> . Londrina/PR, 2018 .....	44
<b>Tabela 3.5.2 -</b>	Porcentagem de germinação (GERM) e plântulas anormais (PA), índice de velocidade de germinação (IVG), comprimento (CP) e massa seca de plântulas (MSP) de <i>D. delicata</i> . Londrina/PR, 2018.....	46
<b>Tabela 3.5.3 -</b>	Comprimento da parte aérea (CPA) e raiz (CR), massa seca da parte aérea (MSPA) e raiz (MSR) de <i>D. brevifolia</i> e <i>D. delicata</i> após 180 dias de cultivo em casa de vegetação. Londrina/PR, 2018 .....	48

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>10</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>12</b>
2.1	A FAMÍLIA BROMELIACEAE.....	12
2.2	BROMÉLIAS NO BRASIL .....	15
2.3	GÊNERO DYCKIA.....	17
2.3.1	Dyckia brevifolia .....	19
2.3.2	Dyckia delicata .....	21
2.4	IMPORTÂNCIA ECOLÓGICA E ECONÔMICA .....	22
2.5	SEMENTES ORTODOXAS E RECALCITRANTES .....	24
2.6	HISTÓRICO DA CRIOPRESERVAÇÃO .....	25
2.7	CRIOPRESERVAÇÃO: CONCEITO E FUNDAMENTOS .....	27
2.8	CRIOPROTETORES .....	28
2.9	MÉTODOS DE CRIOPRESERVAÇÃO.....	30
2.9.1	Congelamento Lento .....	30
2.9.2	Vitrificação .....	32
2.10	CRIOPRESERVAÇÃO DE BROMÉLIAS.....	35
<b>3</b>	<b>ARTIGO - CRIOPRESERVAÇÃO DE SEMENTES DAS BROMÉLIAS BRASILEIRAS AMEAÇADAS DE EXTINÇÃO DYCKIA BREVIFOLIA E DYCKIA DELICATA</b> .....	<b>36</b>
3.1	RESUMO .....	36
3.2	ABSTRACT.....	37
3.3	INTRODUÇÃO .....	38
3.4	MATERIAL E MÉTODOS.....	39
<b>4</b>	<b>CONSIDERAÇÕES GERAIS</b> .....	<b>51</b>
<b>5</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>52</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A família Bromeliaceae está distribuída quase que exclusivamente na América do Sul, sendo o Brasil importante centro de biodiversidade, com a presença de espécies em praticamente todos os biomas. As bromélias são muito utilizadas como plantas ornamentais e algumas têm importância econômica, como o abacaxi (*Ananas comosus*), e outras são importantes na produção de medicamentos e xaropes caseiros. Além disso, apresentam um papel relevante na biodiversidade de ecossistemas, servindo de abrigo, alimentação e reprodução para uma enorme quantidade de organismos (KUBTZKI, 1998; CHWEE; AHMAD, 2008).

Porém, devido a mudanças em seu habitat causadas pelo desmatamento, queimadas e extrativismo, muitas espécies estão seriamente ameaçadas de extinção. O Brasil neste cenário apresenta números preocupantes visto que, entre as espécies consideradas ameaçadas de extinção, de acordo com a Lista Oficial de Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção (BRASIL, 2008), 38 são bromélias e entre elas, estão espécies endêmicas.

Entre as espécies que se encontram em ameaça, sete pertencem ao gênero *Dyckia*, o qual apresenta sua maior concentração no Brasil, responsável por abrigar cerca de 80% das espécies deste gênero (LEME; RIBEIRO; MIRANDA, 2012). Entre as espécies, estão *Dyckia delicata* e *Dyckia brevifolia*, endêmicas e presentes exclusivamente no sul do Brasil. Devido ao seu habitat restrito e sua baixa população na natureza, estas devem ser mantidas sob cuidado. Visto a importância das bromélias na biodiversidade, associada à ameaça de extinção, estudos relacionados à preservação e manutenção deste material na natureza são imprescindíveis.

Avanços tecnológicos e científicos permitiram estudos que possibilitam encontrar formas de preservação de materiais biológicos criando bancos de manutenção. A criopreservação é apresentada como alternativa viável e de baixo custo, que consiste na preservação do material biológico em temperaturas extremamente baixas, de até -196°C. Este método possibilita a redução do metabolismo a tal ponto que a qualidade do material siga intacta e com capacidade para retomar suas atividades metabólicas após seu descongelamento (SANTOS, 2000).

Para o sucesso da criopreservação, é fundamental o conhecimento das fases de congelamento e descongelamento do material, reduzindo ao máximo os danos no processo. As perdas ocorrem por conta do congelamento e formações de cristais de gelo, pois levam a danos celulares podendo ocasionar a morte das mesmas e por este motivo devem ser evitados (SANTOS, 2000).

Para obtenção de bons resultados, a garantia de um material intacto após o congelamento é fundamental. Nesse contexto, os crioprotetores desempenham papel primordial na proteção do material biológico, já que sua função é reduzir ao máximo os danos durante o período de congelamento. Embora estes agentes confirmem proteção ao material biológico, são constituídos de substâncias tóxicas, sendo fundamental o conhecimento e a ação dos mesmos.

Cada uma destas substâncias possui um mecanismo diferente de ação na célula, o que confere sua classificação em dois grupos: as extracelulares, ou seja, as que irão agir fora da célula, como os açúcares (sacarose, trealose e glicose) e os intracelulares, ou seja, aqueles que vão agir no interior da célula, como o glicerol, o dimetilsulfóxido, etileno glicol, entre outros (MAZUR, 1980).

O método de criopreservação por vitrificação é hoje o mais utilizado e trata-se de um método simples, econômico e com excelentes resultados. Baseia-se na utilização de soluções crioprotetoras concentradas, que irão desidratar o tecido a ponto de impedir a cristalização e congelamento do mesmo, garantindo alto restabelecimento do material após o descongelamento (VATJA et al., 1998).

Diante do exposto, o trabalho teve como objetivo avaliar a influência de diferentes soluções crioprotetoras na criopreservação em nitrogênio líquido de sementes das espécies de bromélias brasileiras ameaçadas de extinção *D. brevifolia* e *D. delicata*.

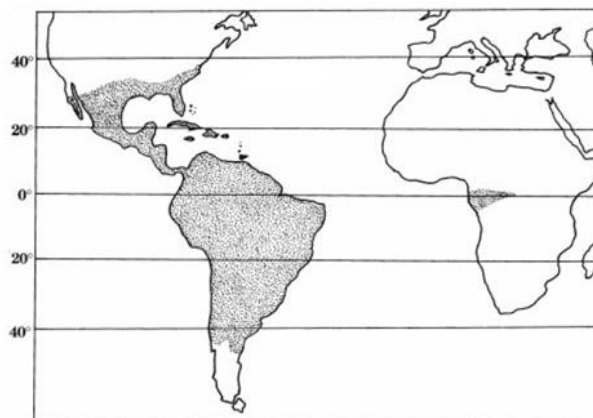
## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 A FAMÍLIA BROMELIACEAE

A história das bromélias teve início em 1493 com a segunda viagem de Cristóvão Colombo ao Novo Mundo. Colombo teria visto na ilha de Guadalupe, no mar das Antilhas, a planta que viria a ser a mais famosa e difundida da família Bromeliaceae, o *Ananas comosus* (L.) Merr., hoje popularmente conhecido por abacaxi. As plantas eram conhecidas pelos nativos como “Karatas”. O nome bromélia foi proposto somente no final do século XVII pelo explorador e botânico francês Charles Plumier, em homenagem ao botânico sueco Olaf Bromel devido às diversas coletas que havia feito em conjunto com Charles Plumier (GRANT; ZIJLSTRA, 1998; ENGLERT, 2000; PAULA, 2000; LUTHER, 2008).

A família Bromeliaceae Juss. é constituída por 58 gêneros e 3.140 espécies (GIVNISH et al., 2011). São distribuídas exclusivamente no continente americano (Figura 2.1.1), exceto por *Pitcairnia feliciana* (A.Chev.) Harms e Mildbr., uma espécie de origem africana (SMITH; DOWNS, 1974; BENZING, 2000). São três os importantes centros de diversidade genética e dispersão das espécies de bromélias: a região andina com prolongamentos em direção ao México e Antilhas, a costa leste do Brasil, representado pela Floresta Atlântica e o Escudo das Guianas (SMITH; DOWNS, 1974).

**Figura 2.1.1** - Distribuição geográfica da família Bromeliaceae.



**Fonte:** Benzing (2000)

As bromélias são plantas que se distribuem em vários habitats, geralmente epífitas, mas podem ser terrícolas ou rupícolas/saxícolas (JUDD et al., 2009). As plantas podem ser de pequeno porte, como *Tillandsia recurvata* (L.) L., com alguns centímetros de

comprimento, até plantas como *Puya raimondii* Harms, com 10 metros de altura (REITZ, 1983). Podem ser encontradas desde o nível do mar até altitudes de 4.000 metros, em desertos até regiões propensas a inundações. De modo geral, as bromélias se desenvolvem bem entre 15° e 30°C, locais ventilados e com alta umidade relativa (PAULA, 2000).

A maioria das bromélias apresenta folhas simples, alternas, podendo ser fortemente serreadas e espiraladas, além de apresentarem entrenós muito curtos. Estas características permitem formar em algumas espécies uma roseta basal em forma de “vaso” ou “tanque”, denominado de filotelmo, que pode acumular água e detritos orgânicos, por onde elas podem absorvem água e nutrientes, através de tricomas peltados (REITZ, 1983; BENZING, 2000).

Os tricomas peltados presentes principalmente nas folhas das bromélias são formados por pêlos escamosos com um escudo central de células, circundado por um anel de células mortas. Estes desempenham importante papel na absorção de água, auxiliando também na reflexão da luz e proteção contra a transpiração excessiva. Além disso, a epiderme e a cutícula retardam a perda de água, atuando como um filtro de densidade neutra, reduzindo a intensidade da luz que atinge as células internas. As bromélias podem apresentar metabolismo CAM (Metabolismo Ácido das Crassuláceas), que promove a economia de água com a captação de CO<sub>2</sub> apenas a noite, além de ser uma peça chave ligada à ocupação de habitats áridos (BENZING, 2000).

As inflorescências das bromélias podem ser terminais ou laterais, simples ou compostas, dispostas em panícula, racemo ou capítulo. As flores geralmente são hermafroditas, de simetria radial, com perianto diferenciado em cálice e corola, dispostas na axila de brácteas e frequentemente brilhantes e coloridas. Os frutos são do tipo cápsula ou baga e as sementes podendo ser aladas e plumosas (SOUZA; LORENZI, 2008; JUDD et al., 2009).

A reprodução das bromélias é assexuada ou sexuada. A reprodução vegetativa é considerada uma estratégia vantajosa em diferentes situações, em especial na ocupação de novos ambientes, favorecendo muitas vezes a formação de grandes colônias. Essa propagação ocorre por brotos axiais procedentes das folhas da roseta, e por rizomas, formando touceiras em torno ou afastando-se da planta-mãe, também podem formar estolhos, principalmente em espécies terrestres (REITZ, 1983; BENZING, 2000).

Reitz (1983) e Benzing (2000) relataram que para que a reprodução sexuada através de sementes ocorra é necessária a polinização das flores. Apesar de apresentarem flores hermafroditas, o processo de autofecundação é incomum nas bromélias, pois

geralmente as flores são protândricas, sendo necessária a polinização cruzada através de agentes polinizadores.

De acordo com Fischer (1994), a maioria das espécies é polinizada por beija-flores, devido à atração causada pelas brácteas vistosas e coloridas além da presença de néctar abundante. Estudos apontam que 61% das espécies de bromélias nos Andes bolivianos são polinizadas pelos beija-flores, e na Mata Atlântica chega a 85% (FISCHER, 1994; VARASSIN, 2002). Assim como as bromélias, os beija-flores também obtém benefício dessa relação, como observado na Mata Atlântica, onde 30% das flores incluídas na alimentação dos beija-flores são de bromélias (BUZATO; SAZIMA; SAZIMA, 2000).

Os morcegos também são importantes agentes polinizadores, sendo atraídos devido à presença de forte odor em flores que só abrem durante a noite. Além da ornitofilia e quiropterofilia, são encontrados outros tipos de polinizadores, como borboletas, abelhas e besouros (REITZ, 1983; LEME; MARINGO, 1993). A dispersão das sementes está diretamente relacionada aos diferentes tipos de frutos presentes na família. As sementes aladas ou plumosas presentes no fruto tipo cápsula são dispersas com o auxílio de vento (anemofilia), enquanto as bagas suculentas, cujas sementes não possuem apêndices, são dispersas por animais (zoocoria) (MARTINELLI, 1997; BUZATO; SAZIMA; SAZIMA, 2000; VARASSIN; SAZIMA, 2000).

A família Bromeliaceae possui uma classificação dividida em três subfamílias: Tillandsioideae, Bromelioideae e Pitcairnioideae (SMITH; DOWNS, 1974, 1977, 1979), classificação esta baseada em caracteres florais, hábito e morfologia de frutos e sementes. Vale lembrar que ainda existe muita controvérsia em relação a esta classificação, devido à análises moleculares, que apontam Pitcairnioideae como um grupo polifilético (CRAYN et al. 2000; HORRES et al., 2000; BARFUSS et al., 2005). Assim, estudos recentes propõem uma nova divisão em oito subfamílias: Brocchinioideae, Bromelioideae, Hechtioideae, Lindmanioideae, Navioideae, Pitacairnioideae, Puyoideae e Tillandsioideae (GIVNISH et al., 2004; GIVNISH; BERRY; SYTSMA, 2007). Mas ainda hoje é adotada a classificação baseada em três subfamílias.

Tillandsioideae é considerada a maior subfamília, compreendendo 1.131 espécies em 9 gêneros: *Alcantarea* (E.Morren) Harms (16 spp.), *Catopsis* Griseb. (21 spp.), *Glomeropitcairnia* (Mez) Mez (2 spp.), *Guzmania Ruiz & Pav.* (176 spp.), *Mezobromelia* L.B. Sm (9 spp.), *Racinaea* Spencer Smith (56 spp), *Tillandsia* L. (551 spp.), *Vriesea* Lindl. (227 spp.) e *Werauhia* Grant (73 spp.) (SMITH; DOWNS, 1977; TILL, 2000; LUTHER, 2008). As espécies geralmente são epífitas, com folhas de margens inteiras, ovário súpero ou

raramente semi-ínfero e sementes com tufos de apêndices plumosos nas extremidades (REITZ, 1983).

Bromelioideae possui 31 gêneros e 724 espécies (CRONQUIST, 1988; SMITH; TILL, 1998; KUBITZKI, 1998). As espécies podem ser epífitas, terrícolas ou rupícolas. As sementes não apresentam apêndices, e a maioria das espécies possui ovário ínfero e frutos do tipo baga indeiscente, diferente das subfamílias Pitcairnioideae e Tillandsioideae que apresentam sementes com apêndices, ovário em parte ou completamente súpero e frutos capsulares (REITZ, 1983; BARFUSS et al., 2005).

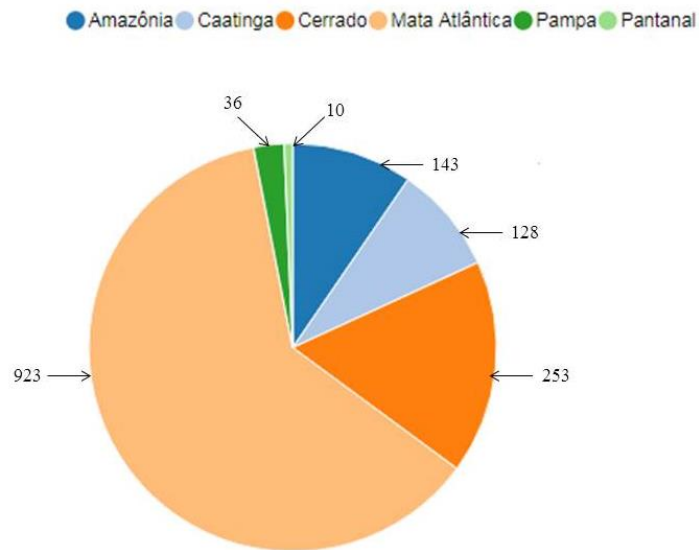
A subfamília Pitcairnioideae possui 16 gêneros e aproximadamente 1050 espécies, geralmente epífitas, mas podendo ser terrícolas, saxícolas ou rupícolas, apresentam folhas aculeadas, com margens inteiras, frutos do tipo cápsula e sementes com apêndices não plumosos (REITZ, 1983; CRONQUIST, 1988; SMITH; TILL, 1998; KUBITZKI, 1998; LUTHER, 2008). Os gêneros mais importantes dessa subfamília são: *Pitcairnia*, com cerca de 320 espécies; *Puya*, com aproximadamente 190 espécies; *Dyckia*, apresentando por volta de 200 espécies e *Navia* com 105 espécies (LUTHER, 2008).

## 2.2 BROMÉLIAS NO BRASIL

O Brasil é um dos três principais centros de diversidade genética e de dispersão das bromélias (SMITH; DOWNS, 1974), distribuindo-se pelo território, 46 gêneros e 1.341 espécies, sendo 20 gêneros e 1.117 espécies endêmicas (REFLORA, 2018). O país representa cerca de 40% das bromélias já catalogadas (LEME; MARINGO, 1993), e entre os estados com a maior presença de espécies destacam-se a Bahia (356), Espírito Santo (325), Rio de Janeiro (323) e Minas Gerais (307) (REFLORA, 2018).

Apesar de serem encontradas em todos os biomas brasileiros (Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal) (Figura 2.2.1), está na Mata Atlântica sua maior diversidade, com 923 espécies, sendo 653 endêmicas deste bioma (MARTINELLI et al., 2008; REFLORA, 2018).

**Figura 2.2.1-** Distribuição de espécies da família Bromeliaceae por bioma brasileiro.



**Fonte:** Adaptado de [www.floradobrasil.jbrj.gov.br](http://www.floradobrasil.jbrj.gov.br) (2018)

Entretanto, a Mata Atlântica é considerada uma das maiores áreas em risco de extinção no mundo (HERINGER; MONTENEGRO, 2000) e, segundo listas oficiais de espécies ameaçadas, cerca de 40% das espécies de bromélia neste ambiente estão inclusas em alguma categoria de ameaça (MARTINELLI et al., 2008).

No Brasil, o trabalho taxonômico mais abrangente e relatado para a família Bromeliaceae foi realizado por Smith (1955) na obra “The Bromeliaceae of Brazil”, na qual foram citadas cerca de 1.350 espécies. Outros trabalhos mais específicos por estado também foram realizados. Um levantamento das bromélias no Rio de Janeiro encontrou 245 espécies distribuídas em 20 gêneros (FONTOURA; COSTA; WENDT, 1991). Já em Santa Catarina e em São Paulo, importantes trabalhos taxonômicos sobre as bromeliáceas foram realizados. Reitz (1983), na obra “Flora Catarinense”, citou 105 espécies distribuídas em 16 gêneros e em São Paulo um estudo identificou 160 espécies em 18 gêneros (WANDERLEY; MARTINS, 2007).

No Paraná são citadas 112 espécies distribuídas praticamente por todo o estado. Poucos são os estudos relacionados à família Bromeliaceae, apenas com gêneros específicos (TARDIVO; CERVI, 1997). Uma das poucas informações é o levantamento florístico de epífitas vasculares no Parque Barigui (Curitiba), identificando 11 espécies sendo quatro do gênero *Tillandsia* (DITTRICH; KOZERA; SILVA, 1999). Estevan (2010), em estudos no nordeste do estado identificou 35 espécies pertencentes a dez gêneros, sendo em maior número de espécies os gêneros *Tillandsia* (11) e *Dyckia* (8).

Vale ressaltar a importância do Brasil como centro de diversidade dessa família. De acordo com a Lista Oficial de Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção, instrução normativa do Ministério do Meio Ambiente (MMA) nº 6/2008 (BRASIL, 2008), 38 espécies são de bromélias, o que demonstra a importância de serem realizados estudos para a preservação deste material.

### 2.3 GÊNERO *DYCKIA*

O gênero *Dyckia* Schult. & Schult. f. pertence à subfamília Pitcairnioideae, composto por 164 espécies (GOUDA; BUTCHER; GOUDA, 2014), que caracterizam-se pela ausência de tanques de armazenamento e de tricomas efetivos de absorção (SMITH; DOWNS, 1974; REITZ, 1983; FORZZA, 2001). As espécies deste gênero podem ser encontradas na América do Sul (Brasil, Argentina, Bolívia, Paraguai e Uruguai) ocorrendo especialmente no Brasil (Figura 2.3.1) (SMITH; DOWNS, 1974; REITZ, 1983).

**Figura 2.3.1** - Área de ocorrência do gênero *Dyckia* Schult. & Schult.f.



**Fonte:** Krapp, Pinange, Benko-iseppon, Leme, Weising (2014)

No Brasil, são registradas 141 espécies e, destas, 133 são endêmicas (REFLORA, 2018). O país é responsável por abrigar aproximadamente 83% das espécies, com ocorrência desde o nível do mar até aproximadamente 1.000 metros de altitude (LEME;

RIBEIRO; MIRANDA, 2012). O gênero apresenta seu centro de diversidade no cerrado (KRAPP et al., 2014) com 82 espécies, mas pode ser encontrado também na Mata Atlântica (39), Pampa (17), Caatinga (11), Amazônia (4) e Pantanal (3). A maior ocorrência do gênero é no estado de Minas Gerais com 36 espécies, seguido de Goiás (30) e Rio Grande do Sul (28). Para o Paraná são referenciadas 12 espécies (REFLORA, 2018).

As espécies são principalmente terrestres ou rupícolas e crescem em solos bem drenados ou afloramentos rochosos. Algumas possuem a capacidade de sobreviver em ambientes frequentemente inundados (LEME; RIBEIRO; MIRANDA, 2012), conhecidas como reófitas. Estas são plantas confinadas às margens de córregos e rios de fluxo rápido, sujeitas à ação de inundações frequentes. Algumas destas espécies são características do sul do Brasil (KLEIN, 1979), entre elas *D. brevifolia*, *D. distachya*, *D. ibiramensis* e *D. microcalyx* (KLEIN, 1979; FORZZA, 2005).

De acordo com Ab'Saber (2003), as populações de *Dyckia* sempre ocorrem em ambientes xéricos. Estes ambientes impedem condições de crescimento de plantas de grande porte que poderiam sombreá-las, ou de plantas herbáceas que poderiam concorrer com as plantas jovens, impedindo a formação de novas touceiras. Para Kranz (2013), as plantas que vivem exclusivamente nesses locais são chamadas de relictas e as populações são sempre reduzidas e limitadas ao ambiente em que se encontram, e muitas vezes estão reduzidas a poucos metros quadrados.

As plantas se multiplicam pela divisão do caule principal, pela produção de estolões e por sementes. Foram observadas que poucas espécies possuem crescimento monopodial, isto é, não dividem o caule principal, como em *D. aurea*. Por outro lado, em espécies como *D. brevifolia* e *D. distachya* é frequente a divisão do caule principal e abundante a emissão de estolões, formando grandes aglomerados de plantas. O número ou colônias de plantas em todos os locais de ocorrência é reduzido (KRANZ, 2013).

A produção de sementes férteis é abundante em todas as populações observadas. Porém, as condições climáticas atuais muito áridas nos ambientes em que ocorrem as *Dyckias*, não permitem que as sementes germinem e as plântulas se fixem no substrato e sobrevivam. Com isso, plantas jovens, com até cerca de três anos raramente são observadas. Quando as sementes germinam, morrem antes de se fixarem ao substrato e terem condições de sobreviver durante o período de uma pequena estiagem (KRANZ, 2013).

Apresentam folhas suculentas com grande quantidade de espinhos rígidos, raízes funcionais e escamas foliares pouco eficientes na absorção de água e nutrientes (PAULA; SILVA, 2004). As bainhas são, em sua maioria, carnosas com lâminas triangulares, geralmente espinhosa-serradas e rígidas. As flores apresentam coloração variada entre amarelo e vermelho (REITZ, 1983; FORZZA, 2001). Sua estrutura reprodutiva e pigmentação floral sugerem polinização por insetos (BENZING, 1980; VARADARAJAN; BROWN, 1988), e os poucos estudos realizados com espécies deste gênero indicam os beija-flores como os principais polinizadores (BERNARDELLO; GALETTO; JULIANI, 1991; VOSGUERITCHIAN; BUZATO, 2006).

Entre 1995 e 2013, Kranz (2013) estudou 129 populações nativas de *Dyckia*, distribuídas nos seguintes Estados: Mato Grosso (40); Paraná (22); Goiás (22); Mato Grosso do Sul (14); Santa Catarina (9); Minas Gerais (8); Rio Grande do Sul (7); Tocantins (5) e São Paulo (1). Segundo Martinelli et al. (2008), o gênero *Dyckia* possui ainda um grande número de espécies indeterminadas ou com identificação imprecisa, sugerindo a realização de uma revisão urgente. Ressalta-se que das espécies presentes no Brasil que se encontram em risco de extinção, sete pertencem a este gênero (BRASIL, 2008).

### 2.3.1 *Dyckia brevifolia*

A espécie *Dyckia brevifolia* Baker. é originária do Brasil, sendo considerada uma espécie reófito por ocorrer em ambientes específicos como leito de rios, corredeiras e rochas expostas (Figura 2.3.1.1) de áreas montanhosas do estado do Paraná e Santa Catarina (FORZZA et al., 2011). De acordo com Rogalski (2007), esta espécie ocorre acima do nível da água, mas regularmente são atingidas pelas cheias. Pode ser encontrada em uma extensão de cerca de 80 km ao longo do Rio Itajaí-Açu, de Lontras até Blumenau, porém ocorre de forma desuniforme.

**Figura 2.3.1.1** - *Dyckia brevifolia* Baker. registrada em seu habitat.



**Fonte:** Walter Miguel Kranz (2018)

De acordo com Klein (1979) e Reitz (1983) é também caracterizada como espécie heliófila, ou seja, capaz de tolerar a luz solar intensa e também adaptar-se aos extremos do fluxo do rio, seja por estar submersa durante as inundações, ou sofrer com a desidratação durante os períodos de seca levando a baixa da maré. *Dyckia brevifolia* é uma planta com folhas abundantes, em densa roseta basal, de 10 a 20 cm de comprimento, lâminas lanceolado-triangulares, agudas, muito grossas, com 25 a 35 mm de largura, glabras em cima e serradas nas bordas com presença de espinhos (Figura 2.3.1.2) (KLEIN, 1979).

**Figura 2.3.1.2** - Visão geral da roseta de *Dyckia brevifolia* Baker.



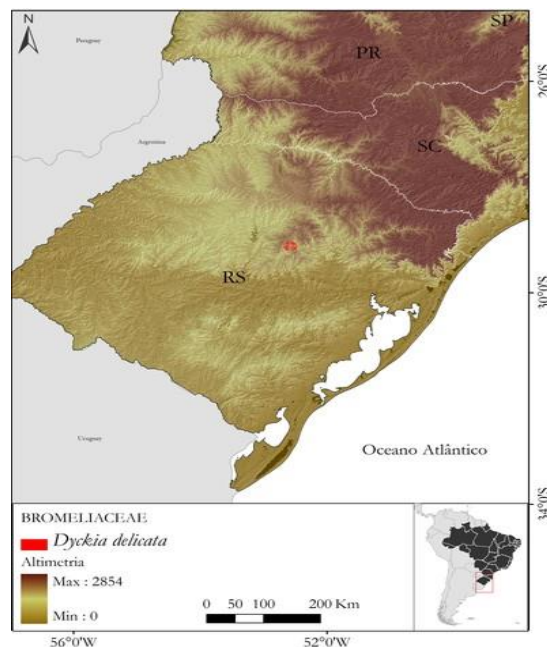
**Fonte:** Ghislaine Mario Lobo (2007)

Em decorrência do desmatamento e da construção de represas, a espécie está ameaçada de extinção (ROGALSKI, 2007). Em virtude disto, foi classificada como "Em Perigo" (EN) pela Lista de Espécies Ameaçadas do Paraná (SEMA/PR, 1995) e do Rio Grande do Sul (CONSEMA-RS, 2002). Recentemente, em 2014, através da Avaliação do Estado de Conservação de Espécies Flora - RS (FZB/RS, 2014), a espécie manteve a classificação "Em Perigo" (EN). Esta classificação indica que a espécie provavelmente será extinta num futuro próximo. Este é o segundo estado de conservação mais grave para as espécies na natureza (O ECO, 2014).

### 2.3.2 *Dyckia delicata*

A espécie *Dyckia delicata* Larocca & Sobral. é endêmica do Brasil. Presente apenas na Mata Atlântica, sobre os floramentos rochosos, a espécie tem habitat rupícola. É encontrada exclusivamente no Estado do Rio Grande do Sul (Figura 2.3.2.1) (LAROCCA; SOBRAL, 2002; FORZZA et al., 2011; REFLORA, 2018).

**Figura 2.3.2.1** - Mapa de Ocorrência de *Dyckia delicata* Larocca & Sobral.



**Fonte:** CNCFlora (2012)

Foi descrita em 2002 por LaroCCA & Sobral, e caracteriza-se morfológicamente por folhas glabras, espinhos macios, inflorescências simples ou compostas, e sementes em formato triangular (Figura 2.3.2.2) (LAROCCA; SOBRAL, 2002; GIULIETTI et al., 2009).

**Figura 2.3.2.2** - *Dyckia delicata* LaroCCA & Sobral. representada em (A) Espécime in habitat (B) Inflorescência.



**Fonte:** Henrique Mallmann Büneker (2015)

Devido à degradação no entorno de seu habitat, a espécie foi avaliada como “ criticamente em perigo ” (CR) pelo Centro Nacional de Conservação da Flora (CNCFlora, 2012). Esta classificação foi mantida em 2014 pela Avaliação do Estado de Conservação de Espécies Flora - RS (FZB/RS, 2014). Esta é categoria de maior risco atribuída pela Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas. São aquelas espécies que enfrentam risco extremamente elevado de extinção na natureza (O ECO, 2014).

#### 2.4 IMPORTÂNCIA ECOLÓGICA E ECONÔMICA

É conhecido há muito tempo o potencial ornamental trazido pelas bromélias. Na década de 80 as bromélias já ganhavam destaque por sua variedade de forma, cor e folhas, que geralmente são dispostas em rosetas, além da presença de inflorescências com brácteas coloridas (REITZ, 1983).

As bromélias são utilizadas como plantas ornamentais devido à beleza e durabilidade de suas inflorescências, e entre elas, destacam-se as espécies dos gêneros *Guzmania*, *Vriesea* e *Aechmea*, bem como seus híbridos (MURARO, 2006). Cerca de 40

espécies desses gêneros foram introduzidas nos EUA, sendo tradicionalmente cultivadas para vendas em vasos ou na forma de flores de corte (CATHCART, 1995).

Além do potencial ornamental, as bromélias apresentam expressiva importância econômica como alimentos, remédios e produção de fibras (MURARO, 2006). Entre as bromélias, o abacaxi (*Ananas comosus* (L.) Merr.) é a espécie de maior importância econômica, muito apreciada na alimentação humana. O abacaxi ainda tem importância farmacêutica, na extração da enzima “bromelina” (KUBTZKI, 1998; CHWEE; AHMAD, 2008). Outra espécie de grande importância é a *Neoglaziovia variegata* (Arr. Cam.) Mez, utilizada como fonte de fibras (KUBTZKI, 1998), e na medicina natural destaca-se a *Bromelia antiacantha* Bertol. na produção de xaropes caseiros (ZANELLA et al., 2011).

As bromélias têm grande importância no cenário nacional da conservação da biodiversidade (MARTINELLI et al., 2008), desenvolvendo complexas interações com outros vegetais, animais e microrganismos. Estes por sua vez, são parcialmente ou totalmente dependentes do micro-habitat aquático formado em seus “tanques”, sendo fonte importante para a alimentação, abrigo e reprodução destes organismos (DELCLARO, 2012), e participa também dos processos de ciclagem de minerais e água (BENZING, 2000; OLIVEIRA, 2004).

Os microambientes formados pelo acúmulo de água e detritos nos tanques das bromélias são muito utilizados por diversas espécies, que utilizam este ambiente como fonte de alimento e abrigo para a reprodução, pois necessitam de água em seus primeiros estádios de vida (WITTMAN, 2000; SILVA, 2009). Esses microambientes formados nas bromélias abrigam vários tipos de organismos como: aracnídeos, crustáceos, platelmintos, oligoquetos, nematóides, moluscos e miriápodes (ROMERO, 2005).

Dentre os diversos tipos de interações planta-animal, são comuns estudos que abordam a relação entre flores e seus visitantes. De acordo com Barbosa-Filho e Araújo (2007), a família Bromeliaceae está entre as poucas em que a polinização por vertebrados predomina sobre a entomofilia. Destacam-se entre os vertebrados, os beija-flores e morcegos, que além de encontrarem nas bromélias sua fonte de alimentação, acabam fazendo o importante papel de polinização.

Em virtude da grande procura das bromélias, o extrativismo ilegal intensificou-se, contribuindo para o aumento do número de plantas vulneráveis, ameaçadas ou até mesmo em extinção (BERED et al., 2008). Gonzalez-Astorga et al. (2004), confirmaram que perturbações antrópicas como desmatamento, queimadas, extração de bromélias em áreas de preservação são formas de interferência capazes de interromper o fluxo gênico entre populações de uma espécie. Com isso a recomposição do bioma de forma natural

não ocorre, levando a uma interferência nas relações existentes nessa área, podendo acarretar na extinção das espécies e outras que estejam associadas a estas.

Apesar da importância econômica e ecológica dessa família e do número de trabalhos referentes à mesma estar aumentando, os trabalhos científicos ainda são consideravelmente reduzidos (ZANELLA et al., 2012), o que demonstra que ainda há muito no que avançar e conhecer sobre as bromélias.

## 2.5 SEMENTES ORTODOXAS E RECALCITRANTES

O armazenamento tem por objetivo básico a preservação da qualidade fisiológica das sementes, sendo fundamental para a manutenção dos bancos de germoplasma e para a semeadura de plantio comercial ou também da reocupação da vegetação em áreas degradadas (KOHOMA et al., 2006). Dependendo do objetivo, pode ser necessária a preservação das sementes por períodos curtos ou longos de tempo (FLORIANO, 2004).

Para a eficácia da preservação e armazenamento de sementes, é necessário que sua qualidade seja mantida por um longo período de tempo e, devido à sua complexa fisiologia, é fundamental um prévio conhecimento destas etapas (HONG; LININGTON; ELLIS, 1996). Diversas técnicas têm sido estudadas visando melhores condições de armazenamento, sendo o objetivo principal a redução do metabolismo da semente, obtida através da dessecação ou diminuição da temperatura (KOHOMA et al., 2006).

A tolerância à dessecação, que permite as sementes serem armazenada por um longo período sem perda de viabilidade, na maior parte, é adquirida durante a maturação. Essa capacidade de armazenamento varia entre as espécies, mesmo em um lote comum de sementes (GROOT et al., 2003). Essa tolerância está relacionada à capacidade do organismo em enfrentar o estresse da quase completa perda de água e, posterior reidratação dos tecidos das sementes (HOEKSTRA; GOLOVINA; NIJSSE, 2003).

Para Hong e Ellis (1991), a classificação das sementes quanto a sua tolerância ao armazenamento depende de contínuos estudos quanto à dessecação e ao armazenamento a baixas temperaturas. Seguindo isto, Nery et al. (2014) classificam as sementes em ortodoxas, recalcitrantes ou intermediárias, baseado na maior ou menor tolerância à dessecação e ao seu armazenamento em baixas temperaturas.

Ortodoxas são sementes que conseguem suportar um grau de umidade entre 5 a 7 % e armazenamento sob baixas temperaturas (-18°C) e por um longo período de tempo, preservando sua qualidade fisiológica. As que são sensíveis à dessecação, ou seja, não toleram

baixos conteúdos de água (<10%), o que impede seu armazenamento por um longo prazo, são as sementes classificadas como recalcitrantes (ROBERTS, 1973). As sementes de bromélia comportam-se como ortodoxas, sendo possível seu armazenamento em baixa umidade e temperatura. Marcos Filho (2005) caracteriza este tipo de semente como tolerante à secagem a um baixo teor de umidade, sem prejudicar seu metabolismo e assim ser realizado seu armazenamento por um longo período de tempo.

Sementes ortodoxas, durante sua formação, apresentam três fases principais, a histo-diferenciação, maturação e secagem, o que lhes conferem tolerância à dessecação, a qual é mantida após a dispersão, reassumindo seu metabolismo assim que são reidratadas e fornecidas condições favoráveis de germinação (BEWLEY; BLANCK, 1994). Por outro lado, as espécies recalcitrantes não apresentam a fase de secagem durante o desenvolvimento, sendo dispersas com alto conteúdo de água e estão metabolicamente ativas no momento da dispersão, o que as tornam sensíveis à dessecação (BERJAK; PAMMENTER, 2000).

Existe um grupo de sementes que tolera a desidratação entre 7-10% de umidade e podem ser armazenadas a baixas temperaturas (geralmente acima de 0 °C). Estas podem ser conservadas por um período não prolongado, sendo as sementes conhecidas como intermediárias (HONG; LININGTON; ELLIS, 1996; SACANDÉ et al., 2004).

## 2.6 HISTÓRICO DA CRIOPRESERVAÇÃO

A criobiologia, ou seja, a ciência dedicada ao estudo dos efeitos das baixas temperaturas em tecidos, órgãos ou organismos vivos é utilizada desde 2500 a.C. no Egito para fins medicinais (BARBOSA; SANVITTO, 1973). Porém, a ampliação de estudos na área de criobiologia só ocorreu no início de 1950.

Em 1949 foi criopreservado pela primeira vez sêmen de touro por uma equipe de cientistas liderada pelo Biólogo Christopher Polge (BATISTA, 2006), fato este que desencadeou um aceleramento de pesquisas na área. Durante este estudo foi feita a descoberta acidental da ação crioprotetora do glicerol, que revolucionou os métodos de criopreservação em diversas células e tecidos (POLGE; SMITH; PARKERS, 1949).

Em 1950, Dr. Audrey Smith realizou com sucesso a criopreservação de hemácias usando como crioprotetor o glicerol a - 80°C (VALERI; RAGNO, 2005). Outras substâncias passaram a ser utilizadas como crioprotetores. Lovelock e Bishop (1959) utilizaram o dimetilsulfóxido (DMSO) como agente crioprotetor na preservação de sêmen de touro e hemácias humanas e bovinas, já que o mesmo conferia maior variabilidade a tipos

celulares em relação ao glicerol. Entretanto, na década de 80, Fahy (1986) em seus estudos considerou o efeito tóxico desse agente e isso se tornou um obstáculo. Outras substâncias como o etileno glicol, metanol, açúcares, entre outras vieram a ter a mesma finalidade crioprotetora.

No caminho contrário, a criopreservação vegetal progrediu lentamente se comparada com os trabalhos envolvendo tecidos animais, e somente nos anos 60 os primeiros trabalhos foram relatados. Sakai (1960) relatou a sobrevivência de tecidos vegetais quando expostos a baixíssimas temperaturas ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) por meio da utilização de brotos de amoreira desidratados imersos em nitrogênio líquido e, demonstrou a viabilidade dos mesmos após seu descongelamento.

Na década de 70 foi publicado o primeiro protocolo de criopreservação vegetal, estabelecido através de células de cenoura utilizando o método de congelamento lento. Este método é considerado uma metodologia clássica, partindo do princípio de desidratação, adição de soluções crioprotetoras, congelamento lento seguido da imersão rápida em nitrogênio líquido. Este método predominou até meados da década de 80 (ENGELMANN, 1997; SILVEIRA, 2015), com pouca utilidade nos dias de hoje.

Na busca de maior eficiência na proteção das células durante o congelamento, Fahy et al. (1984), através do estudo de criopreservação de embriões de camundongos, desenvolveram o chamado método contemporâneo de criopreservação. Este método se baseia na vitrificação, ou seja, na transformação de uma solução aquosa num líquido amorfo com aspecto vítreo devido a um congelamento muito rápido, evitando a formação dos cristais de gelo que causam injúrias às membranas celulares, dificultando assim danos no material congelado.

No início da década de 1990, novos estudos em relação à criopreservação foram desenvolvidos. Dumet et al. (1993) utilizaram a desidratação em sílica gel em embriões somáticos de uma palmeira híbrida. Dereuddre et al. (1994) descreveram o método do encapsulamento em alginato de cálcio, obtendo altas taxas de restabelecimento de embriões somáticos de café, ápice caulinar de pêra e maçã. Recentemente, em 2011, foi publicado o primeiro trabalho que constatou a eficiência do floroglucinol como aditivo crioprotetor de protocormos de orquídeas (VENDRAME; FARIA, 2011).

## 2.7 CRIOPRESERVAÇÃO: CONCEITO E FUNDAMENTOS

A criopreservação consiste em um método de preservação do material biológico em temperaturas extremamente baixas, de até  $-196^{\circ}\text{C}$  em nitrogênio líquido ou em sua fase de vapor a  $-150^{\circ}\text{C}$  com a manutenção do material após o seu descongelamento (SANTOS, 2000). Possui como princípio básico a redução de temperatura a fim de reduzir o metabolismo celular, possibilitando que as células ou os tecidos sejam preservados por um período indeterminado de tempo e permitindo a posterior retomada do desenvolvimento celular (PEGG, 2007).

A preservação de sementes em nitrogênio líquido foi inicialmente desenvolvida com a finalidade de garantir recursos genéticos de espécies de importância agrícola, porém seu foco vem mudando, sendo muito utilizada para a manutenção de espécies vegetais ameaçadas de extinção, utilizando-se além de sementes, outras partes vegetais como: embriões, pólen, bulbos, gemas, raízes, entre outros (JUNIOR, 2013).

Os estudos sobre a criopreservação de materiais vegetais foi sendo intensificado e diversos resultados mostram o sucesso desta forma de preservação das mais variadas espécies, tais como *Jatropha curcas* L. (GOLDFARB; DUARTE; MATA, 2010), *Tabebuia impetiginosa* (Mart. ex DC.) Standl. (MARTINS et al., 2009) e *Ricinus communis* L. (SANTOS, 2010), entre outras.

O sucesso da criopreservação envolve a necessidade de um controle rigoroso de procedimentos para a desidratação, permeabilidade crioprotetora e duração adequada da exposição a soluções crioprotetoras, para a prevenção de injúrias causadas pelo estresse osmótico e toxicidade dos componentes químicos das soluções crioprotetoras durante este processo (VAJTA et al., 1998; JUNIOR, 2013).

Para Benson et al.(2008), e Simione (2013), as etapas de congelamento e descongelamento do material são fundamentais já que estes afetam estruturas e propriedades coligativas da água, que resultam em rupturas e injúrias letais. Existem dois tipos de injúrias decorrentes do processo de congelamento que devem ser evitadas a fim de alcançar sucesso na criopreservação: a formação de gelo intracelular e a cristalização de gelo extracelular, que podem vir a provocar a ruptura da membrana, levando a lise celular e conseqüente morte da célula (DAY et al., 2008; VIEIRA, 2013).

Um ponto fundamental é a diminuição do conteúdo de água das células e tecidos antes da imersão em nitrogênio líquido, já que a maioria das células ou explantes contêm quantidades elevadas de água (ENGELMANN, 2011). De acordo com Vendrame et

al. (2014), se houver pouca água nos tecidos, estes sofrerão desidratação excessiva e não sobreviverão. Por outro lado, se houver uma grande quantidade de água, haverá a formação de cristais de gelo no interior das células que podem ocasionar o rompimento da membrana celular e levar à morte das mesmas e, para isto deve-se obter um teor de água ideal no processo de congelamento.

Nessas condições de baixas temperaturas, o material é levado a um estado em que praticamente não ocorre divisão celular e o metabolismo é paralisado permitindo a preservação desse material por um tempo prolongado (VIEIRA, 2000). Uma vez colocadas em nitrogênio líquido, as amostras criopreservadas poderão ser mantidas por período indefinido, sendo que os protocolos disponíveis na literatura com variados tipos de plantas diferem em relação ao tempo de estocagem em nitrogênio líquido, sendo encontrado desde períodos de 30 minutos até dois meses armazenados para fins experimentais (HIRANO et al., 2009).

As vantagens desse método em relação à conservação *in vitro*, é que, além do tempo de preservar ser maior, os riscos de perda do material e os custos para sua manutenção são menores (VIEIRA, 2000).

## 2.8 CRIOPROTETORES

Para o sucesso da criopreservação e obtenção de uma maior taxa de sobrevivência dos tecidos, é necessário entender a complexidade do processo e sua correlação com diversos fatores como o teor de água nas células e o uso de crioprotetores durante a fase de congelamento (BENSON et al., 2008).

Os crioprotetores são definidos como substâncias de classe orgânica variada, agindo na célula durante o período de armazenamento a baixas temperaturas e prevenindo a formação de gelo intra e extracelular e possíveis danos causados pela desidratação (HAN et al., 2009). Segundo Mazur (1980) os crioprotetores podem ser classificados em dois grandes grupos: os extracelulares (não penetrantes) e os intracelulares (penetrantes).

Os crioprotetores extracelulares têm como modo de ação formar um meio hipertônico que promove a saída de água das células, o que leva à sua desidratação, protegendo o material vegetal durante o congelamento. Esses agentes atuam fora da célula reduzindo a chance de formação de cristais de gelo no interior das células, sendo representados por macromoléculas de alto peso molecular como os açúcares (sacarose, trealose, lactose, glicose), lipídios, além de alguns aminoácidos e proteínas, como as proteínas

do leite e as lipoproteínas da gema do ovo, que atuam na estabilização de membranas (AMANN; PICKETT, 1987).

Acredita-se que durante a criopreservação alguns açúcares como a sacarose e a trealose, estabilizam a bicamada de fosfolípidios e garantam a manutenção dos lipídios numa fase fluida na ausência de água (CROWE; CROWE; CARPENTER, 1987; WOELDERD; MATHIJS; ENGEL, 1997).

Os crioprotetores intracelulares são solventes orgânicos de baixo peso molecular que possuem a capacidade de penetrar na célula (POLGE; SMITH; PARKERS, 1949). Estas substâncias conseguem fazer ligações de hidrogênio com a molécula de água, diminuindo assim a formação de cristais de gelo ou reduzindo o aumento de tamanho desses cristais, criando assim um ambiente menos nocivo para as células (DALIMATA; GRAHAM, 1997). Entre os comumente utilizados estão o etileno glicol, propileno glicol, dimetilsulfóxido, glicerol, metanol e etanol (NEVES, 2008).

O glicerol e o etileno glicol são álcoois com capacidade de penetrar as células, sendo o glicerol altamente permeável (SILVA et al., 2003). O glicerol age penetrando a membrana celular através da difusão passiva, permanecendo tanto na membrana quanto no citoplasma (PARKS; GRAHAM, 1992). Já o etileno glicol, devido às suas características de baixo peso molecular e ponto de fusão é amplamente empregado (NEWTON et al., 1998) por apresentar uma baixa toxicidade e uma maior capacidade de penetração nas células (SILVA, 2007).

O dimetilsulfóxido (DMSO), por ser um álcool dipolar, é capaz de interagir ou combinar-se com ácidos nucleicos, carboidratos, lipídeos e proteínas sem alterar a configuração das moléculas (SOJKA et al., 1990). Porém, Simione (2013) mostrou em seus estudos indícios de efeitos danosos quando o DMSO é utilizado à temperatura ambiente. O floroglucinol é um benzenotriol conhecido por proteger as células contra danos oxidativos por radicais livres e possuir efeito crioprotetor contra o stress oxidativo e metabólitos relacionados (BENSON; BREMNER, 2004; KANG et al., 2006), sendo utilizado com o intuito de melhorar o desempenho de soluções crioprotetoras (VENDRAME; FARIA, 2011).

Os agentes crioprotetores intracelulares são ditos como moderadamente tóxicos (SILVEIRA, 2015), mas para Denniston, Michelet e Godke (2000) a utilização conjunta destes com os de ação extracelular (glicose, sacarose, trealose) vem sendo utilizado para minimizar os danos osmóticos e tóxicos. Tendo conhecimento do benefício da interação entre os diferentes crioprotetores, foram desenvolvidas as soluções PVS (Plant vitrification solution), muito utilizadas na criopreservação por terem em sua composição diferentes

crioprotetores em concentrações distintas.

O PVS1 foi inicialmente desenvolvido para suspensões de células de aspargo (URAGAMI et al., 1989; URAGAMI, 1990). O PVS2, originalmente desenvolvido para o tratamento de suspensões celulares de citrus (SAKAI; KOBAYASHI; OIYAMA, 1990), já é utilizado com sucesso para explantes de cerca de 200 espécies (SAKAI, 2003). O PVS3 foi inicialmente desenvolvido para wasabi (MATSUMOTO et al., 1995), aspargos (NISHIZAWA et al., 1993) e também alho (MAKOWSKA; KELLER; ENGELMANN, 1999), sendo utilizado para diferentes espécies.

Teixeira et al. (2014) realizaram algumas alterações nestas soluções no intuito de melhorar a capacidade de transição destas soluções para o estado vítreo e então maximizar o potencial de preservação do material quando submetido ao congelamento. Os crioprotetores em altas concentrações podem causar toxicidade às células ocasionando danos irreversíveis, sendo uma alternativa de minimizar estes efeitos uma breve exposição aos mesmos ou através de resfriamento rápido (VAJTA et al., 1998).

## 2.9 MÉTODOS DE CRIOPRESERVAÇÃO

A tolerância a baixas temperaturas e à desidratação dos tecidos vegetais influenciam diretamente na taxa de sobrevivência dos mesmos, sendo importante conhecer os mecanismos bioquímicos e biofísicos que são responsáveis por garantir a manutenção do material congelado (STUSHNOFF; SEUFFERHELD, 1995).

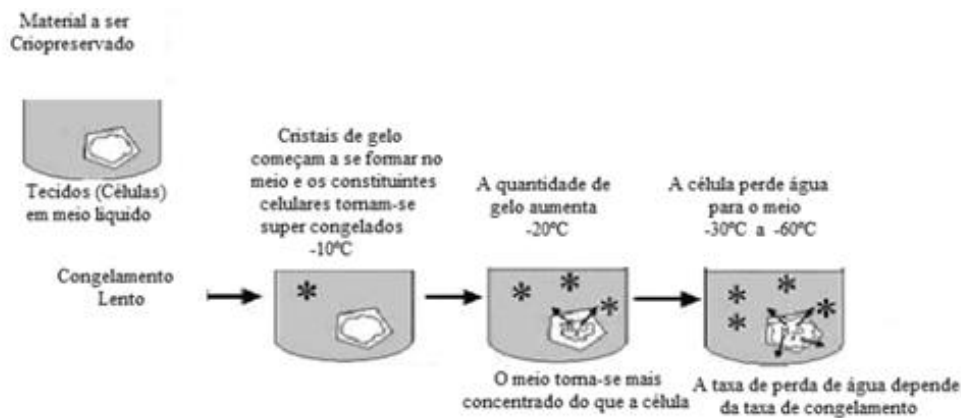
O resfriamento pode ser realizado de duas maneiras: o congelamento lento (metodologia clássica), no qual baixas taxas de resfriamento e baixas concentrações de crioprotetores são utilizados, e o congelamento rápido (metodologia contemporânea), que utiliza altas taxas de resfriamento e altas concentrações de crioprotetores (SARAGUSTY; ARAV, 2011).

### 2.9.1 Congelamento Lento

Segundo Engelmann (1997), um dos primeiros métodos de criopreservação desenvolvidos foi o congelamento lento. Neste, o resfriamento e congelamento do material vegetal é feita de forma lenta até atingir temperatura em torno de  $-40^{\circ}\text{C}$  a uma velocidade de 1 a  $10^{\circ}\text{C hora}^{-1}$ , utilizando um congelador programável e, na sequência, a imersão direta em nitrogênio líquido.

De forma mais detalhada podemos analisar este método com base nos eventos físico-químicos que ocorrem durante o processo de congelamento em condições naturais (Figura 2.9.1.1). À medida que a temperatura vai se aproximando de zero, a célula e seu meio externo atingem um estado de super-resfriamento e, posteriormente, ocorre a formação de gelo no meio extracelular. O conteúdo da célula super-resfriada permanece descongelado, possivelmente porque a parede celular e a membrana plasmática impedem que os cristais de gelo, nos espaços intercelulares penetrem na célula e desencadeiem o congelamento do citoplasma (MAZUR, 1969).

**Figura 2.9.1.1** - Eventos físico-químicos que ocorrem durante o método de congelamento lento.



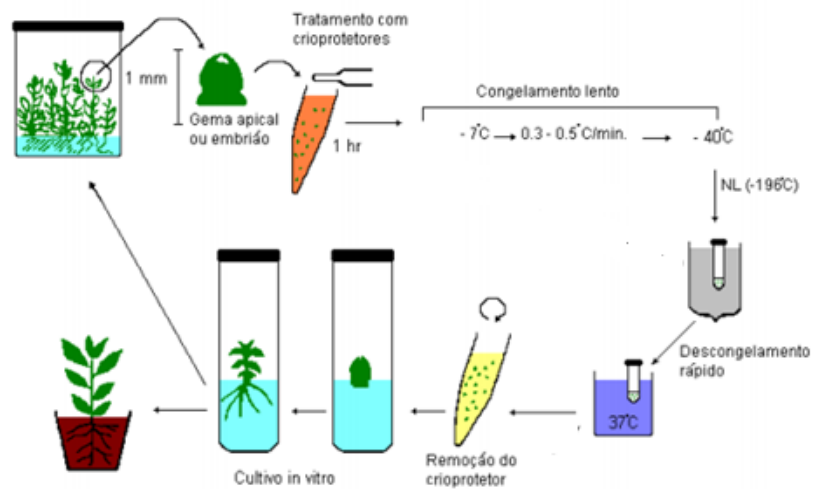
**Fonte:** Adaptado de (Barbosa et al.,2009)

Se o congelamento ocorre lentamente, a água se difunde do interior da célula para o meio externo devido à diferença de pressão de vapor de água. Esse fenômeno é chamado de desidratação induzida por congelamento. Com isso a célula se desidrata, reduzindo a um mínimo ou removendo completamente a água livre presente e evitando, assim, a formação de gelo em seu interior. Como resultado, a concentração da solução celular aumenta e a célula perde turgor. Quando o potencial hídrico das células parcialmente desidratadas iguala-se àquele do gelo extracelular, é estabelecido um equilíbrio e a desidratação para, desde que a temperatura permaneça constante (MAZUR, 1969).

Entretanto, se o congelamento da célula for muito rápido, a desidratação por congelamento não ocorre e as células se tornam cada vez mais super-resfriadas e, eventualmente, a solução intracelular, que contém alto teor de água livre, congela-se, formando cristais de gelo e causando injúrias mecânicas às células (MAZUR, 1969).

Quando as células atingem a temperatura de pré-congelamento, a maior parte da água congelável já escapou, formando gelo no meio externo. Assim, a exposição à temperatura do nitrogênio líquido tem muito pouco efeito adverso (KARTHA, 1985). Após o descongelamento, as células intactas podem reabsorver água e ganhar turgor novamente (SAKAI; LARCHER, 1987). As etapas do processo de congelamento lento são representadas abaixo (Figura 2.9.1.2):

**Figura 2.9.1.2** - Desenho esquemático que ilustra a sequência de etapas dos procedimentos para o congelamento lento no processo de criopreservação.



**Fonte:** Adaptado de Izulmé R.I. Santos (2001)

Um dos pontos negativos desta técnica de criopreservação é a necessidade de um congelador programável que eleva os custos para a realização da mesma (SANTOS et al., 2010). Além disso, a baixa concentração de crioprotetores neste método não é suficiente para impedir a formação de cristais de gelo (ARAV et al., 2002), já que pode manter uma quantidade de água livre para formação de cristais de gelo e levar a danos celulares.

## 2.9.2 Vitriificação

O método de preservação por vitrificação é hoje o método mais utilizado para a criopreservação dos diferentes materiais biológicos, já que é de simples execução, não necessitando do uso de equipamentos sofisticados, trazendo rentabilidade, além de apresentar alta taxa de restabelecimento do material criopreservado (VATJA et al., 1998)

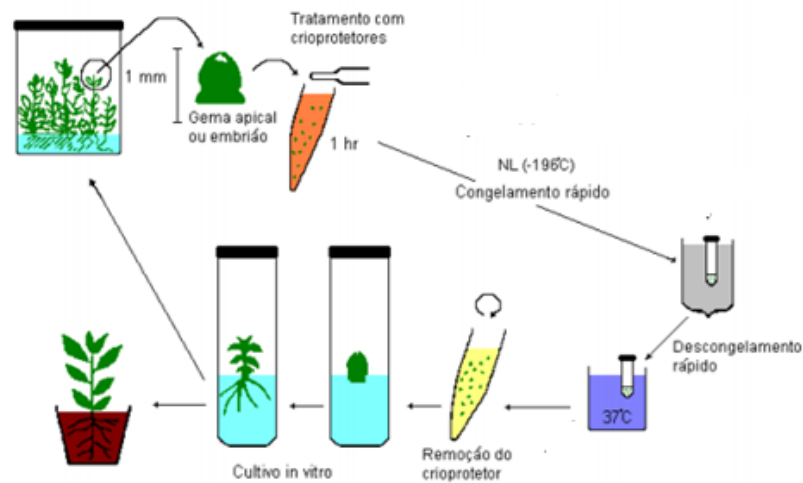
Trata-se de um eficiente processo contra o congelamento sendo caracterizado pela alta concentração das soluções crioprotetoras proporcionando viscosidade à solução fazendo a mesma se comportar como um sólido, porém sem cristalização (ALI; SHELTON, 1993; DOBRINSKI et al., 2000; RUBINSKY, 2003; CHIAN et al., 2004). Quanto maior a concentração de crioprotetores, maior será a temperatura de transição para o estado vítreo, diminuindo assim a chance de cristalização da água e a formação de gelo (SARAGUSTY; ARAV, 2011).

O efeito provocado pela vitrificação pode ser explicado seguindo a lei da termodinâmica que, se um líquido é resfriado muito rapidamente, pode-se evitar o congelamento, por se transformar em um estado viscoso e amorfo (vítreo sólido), ou seja, é essencialmente um fluido com propriedades mecânicas de um sólido (RUBINSKY, 2003; NAIK et al., 2005; BALABAN et al., 2008).

Porém, esta alta concentração de crioprotetores necessária na vitrificação pode ser um ponto desvantajoso desta técnica. Estas soluções concentradas podem promover uma toxicidade química podendo interferir na viabilidade e capacidade de restabelecimento do material congelado (VAJTA, 2000; KULESHOVA; LOPATA, 2002). Para Santos (2000), esta técnica leva a um estado de quase paralisação das atividades metabólicas e, devido a isso, a deterioração de sistemas biológicos é suprimida, assegurando a estabilidade durante este período.

A vitrificação é obtida com o processo de desidratação dos tecidos até certo teor de umidade que não permite água livre para a cristalização, o que pode ser alcançado por dessecação em fluxo laminar ou dessecador com sílica gel e também por tratamento com soluções químicas altamente concentradas, tais como o DMSO, etileno glicol e glicerol (SAKAI, 1995). As etapas do processo de congelamento rápido são representadas abaixo (Figura 2.9.2.1):

**Figura 2.9.2.1** - Desenho esquemático que ilustra a sequência de etapas dos procedimentos para o congelamento rápido no processo de criopreservação.



**Fonte:** Adaptado de Izulmé R.I. Santos (2001)

O PVS2 - Solução de Vitrificação de Plantas (Plant Vitrification Solution 2) é uma das soluções mais utilizadas no processo de vitrificação para materiais vegetais. A solução é composta de 30% de glicerol (v/v), 15% de etilenoglicol (v/v), 15% de DMSO (v/v) e 0,4 mol L<sup>-1</sup> de sacarose (SAKAI; KOBAYASHI; OIYAMA, 1990; NISHIZAWA et al., 1993).

Kartha (1985) e Sakai (1995) relataram que açúcares como a sacarose, trealose e glucose têm sido também utilizadas com essa finalidade, por serem excelentes agentes vitrificantes e por não apresentarem toxicidade para as células vegetais mesmo quando se acumulam em grande quantidade nas células.

O estado vítreo tem muitos outros efeitos benéficos para a célula desidratada, além de evitar a cristalização, tais como: limitação da perda de água, limitação da cristalização de sais e proteínas no citoplasma, proteção contra mudanças no pH e prevenção de colapso celular durante intensa perda de água (LEOPOLD, 1990; KOSTER, 1991).

Após o tratamento com soluções crioprotetoras, o material vegetal é imerso em nitrogênio líquido. Posteriormente, o processo de descongelamento ocorre através da imersão em banho-maria a 40°C, seguido pela remoção dos crioprotetores e testes que verifiquem a viabilidade do material descongelado (BAJAJ, 1995; VENDRAME et al., 2014).

## 2.10 CRIOPRESERVAÇÃO DE BROMÉLIAS

Trabalhos envolvendo a criopreservação de materiais em relação às bromeliáceas ainda são escassos. Resultados obtidos por Ferrari et al. (2016), utilizando sementes da espécie endêmica da caatinga brasileira *Encholirium spectabile* Martius ex Schultes, mostraram não ser necessária a utilização de soluções protetoras obtendo níveis de germinação acima de 90% mesmo sem a proteção das sementes.

Também foram realizados estudos com sementes das espécies *Encholirium heloisae*, *E. pedicellatum*, *E. magalhaesii*, *E. reflexum*, *E. subsecundum*, *E. scrutor*, *Dyckia sordida* e *D. ursina*, em que Tarré et al. (2007), observaram que não houve efeito negativo na porcentagem de germinação, quando as mesmas foram dissecadas em sílica gel antes da imersão em nitrogênio líquido.

Pereira et al. (2010), trabalhando com *Pitcairnia albiflos* mantiveram a viabilidade por um ano das sementes com 5-7% de teor de água após o processo de criopreservação (-196°C), mas o baixíssimo teor de água (3%) teve um efeito prejudicial na longevidade das sementes.

Espécies endêmicas e vulneráveis da Mata Atlântica brasileira (*Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms, *Nidularium ferdinandocoburgii* Wawra, *Pitcairnia albiflos* Herb., *Pitcairnia encholiriodes* L.B.Sm., *Pitcairnia flammea* Lindl., *Vriesea cacuminis* L.B.Sm., *Vriesea friburgensis* L.B.Sm., *Wittrockia gigantea* (Baker) Leme) tiveram sementes preservadas com baixo teor de água (5-7%), após o congelamento em nitrogênio líquido, mantendo a viabilidade por um ano (ALBA; RAFAELA; ANTONIO, 2014).

É necessário salientar que estudos envolvendo a criopreservação em nitrogênio líquido de espécies de bromélias ainda são pouco desenvolvidos, para os quais é necessário o aprofundamento de pesquisas envolvendo as diversas espécies desta família.

### 3 ARTIGO - CRIOPRESERVAÇÃO DE SEMENTES DAS BROMÉLIAS BRASILEIRAS AMEAÇADAS DE EXTINÇÃO *Dyckia brevifolia* E *Dyckia delicata*

#### 3.1 RESUMO

As espécies *Dyckia brevifolia* e *Dyckia delicata* são endêmicas do Brasil e correm risco de extinção em futuro próximo devido à destruição de seus habitats. A criopreservação surge como uma estratégia de preservação destas espécies. O trabalho teve como objetivo avaliar a influência de diferentes soluções crioprotetoras na criopreservação em nitrogênio líquido de sementes das espécies de bromélias brasileiras ameaçadas de extinção *D. brevifolia* e *D. delicata*. O experimento foi realizado utilizando dez tratamentos e quatro repetições por tratamento, sendo estes: sem adição de solução crioprotetora e sem imersão em nitrogênio líquido; imersão em nitrogênio líquido sem adição de crioprotetor; glicerol 1M; glicerol 2M; sacarose 0,4M; sacarose 0,8M; PVS1; PVS2; PVS2 + 1% floroglucinol e PVS3. As sementes permaneceram congeladas em nitrogênio líquido por 15 dias. Foram avaliados os percentuais de germinação e plântulas anormais, índice de velocidade de germinação, comprimento e massa seca de plântulas e seis meses após o plantio das mudas, foi avaliado o comprimento da parte aérea e do sistema radicular, além da massa seca da parte aérea e radicular. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado e os dados obtidos foram submetidos ao teste de Tukey considerando 5% de probabilidade. Na avaliação das plântulas e das mudas, não houve diferença entre a utilização ou não de solução crioprotetora durante a criopreservação. Para as espécies a porcentagem de germinação após a criopreservação variou de 79 a 94%. Para o tratamento sem o uso de crioprotetores, as sementes de *D. brevifolia* e *D. delicata* apresentaram, respectivamente, 92% e 79% de germinação. O uso de crioprotetores não prejudicou a viabilidade das sementes. Sementes de *Dyckia brevifolia* com 6,8% de teor de água e *Dyckia delicata* com 8,9% podem ser criopreservadas em nitrogênio líquido sem a necessidade de soluções crioprotetoras.

**Palavras- chave:** Banco de Sementes. Bromeliaceae. Nitrogênio líquido. Soluções crioprotetoras.

### 3.2 ABSTRACT

*Dyckia brevifolia* and *Dyckia delicata* are endemic to Brazil and are in danger of extinction in the near future due to the destruction of their habitats. Cryopreservation appears as a strategy to preserve these species. This work aimed to evaluate the influence of different cryoprotectant solutions on liquid nitrogen cryopreservation of seeds of endangered Brazilian bromeliads *D. brevifolia* and *D. delicata*. The experiment was carried out using ten treatments and four replicates per treatment, as follow: without addition of cryoprotectant solution and without immersion in liquid nitrogen; immersion in liquid nitrogen without addition of cryoprotectant; 1M glycerol; 2M glycerol; 0.4M sucrose; 0.8M sucrose; PVS1; PVS2; PVS2 + 1% floroglucinol and PVS3. Seeds remained frozen in liquid nitrogen for 15 days. The percentages of germination and abnormal seedlings, germination velocity index, seedling and six months after planting of the seedlings length and dry mass were evaluated, aerial part and root system length, as well as the aerial part and radicular dry mass. The experimental design was completely randomized and the data obtained were submitted to the Tukey test considering a 5% probability. In the evaluation of seedlings and plantlets, there was no difference between the use or not of cryoprotectant solution during cryopreservation. For the species the germination percentage after cryopreservation ranged from 79 to 94%. For the treatment without the use of cryoprotectants, seeds of *D.brevifolia* and *D. delicata* presented, respectively, 92% and 79% of germination. The use of cryoprotectants did not affect the viability of the seeds. *Dyckia brevifolia* seeds with 6.8% water content and *Dyckia delicata* seeds with 8.9% may be cryopreserved in liquid nitrogen without cryoprotective solutions.

**Key words:** Bromeliaceae. Cryoprotection solutions. Liquid nitrogen. Seed Bank.

### 3.3 INTRODUÇÃO

As bromélias pertencem à família Bromeliaceae e são agrupadas em 58 gêneros e 3.140 espécies (GIVNISH et al., 2011), distribuídas quase que exclusivamente pelo continente americano. No Brasil é possível encontrar 83% das espécies do gênero *Dyckia*, sendo as espécies *Dyckia brevifolia* e *Dyckia delicata* endêmicas do sul do país (LEME et al., 2012). As bromélias apresentam importante papel no ecossistema e na manutenção da biodiversidade. Devido à ação do homem e também a mudanças no habitat onde elas vivem, espécies de bromélias como as citadas se encontram ameaçadas de extinção (MARTINELLI; MORAES, 2013).

Visando a manutenção destas e de outras espécies, a criopreservação surge como ferramenta para preservação de materiais vegetais. Trata-se de um método de preservação em que o material biológico é submetido a temperaturas extremamente baixas (-196 °C) em nitrogênio em fase líquida, ou em sua fase de vapor (-150°C) e, após o descongelamento, mantém suas características intactas. Dessa maneira, o material vegetal preservado não sofre danos e pode se desenvolver normalmente após o descongelamento (SANTOS, 2000).

Durante o processo de criopreservação é fundamental evitar a formação de gelo intracelular, além de cristais de gelo que causariam danos celulares e até mesmo a morte das células preservadas. Para isto, durante o processo, se utilizam substâncias crioprotetoras. Estas atuam na célula durante o período de armazenamento a baixas temperaturas e previnem a formação de gelo intra e extracelular, além de evitar possíveis danos causados pela desidratação (HAN et al., 2009).

Cada uma destas substâncias possuem diferentes mecanismos de ação na célula, o que confere a classificação destas em dois grupos: os extracelulares ou não penetrantes e os intracelulares ou penetrantes (MAZUR, 1980). No grupo dos crioprotetores intracelulares, ou seja, aqueles que vão agir no interior da célula se encontram o glicerol, o dimetilsulfóxido e o etileno glicol. Entre os crioprotetores extracelulares, ou seja, que possuem seu mecanismo de ação fora da célula temos principalmente os açúcares, tais como a trealose e a glicose (ENGLAND, 1993).

Para minimizar os possíveis danos osmóticos e tóxicos com o uso destas substâncias, faz-se o uso da utilização combinada de vários crioprotetores, ou também a associação entre os crioprotetores intracelulares com os de ação extracelular. Encontram-se nas soluções PVS (Soluções de vitrificação de plantas) esta variada composição de

crioprotetores e com isso sua grande utilização no processo de criopreservação (DENNISTON et al., 2000).

Porém, alguns crioprotetores, principalmente aqueles que agem intracelularmente, são ditos como moderadamente tóxicos. Para isso é essencial conhecer o mecanismo de ação e possíveis danos que estas substâncias causem ao material biológico a ser congelado (SILVEIRA, 2015).

Algumas espécies acabam tendo mecanismos internos que possibilitam o congelamento das sementes sem nenhuma proteção. Resultados obtidos por Ferrari et al. (2016) utilizando sementes da bromélia *Encholirium spectabile* Martius ex Schultes, mostraram não ser necessária a utilização de soluções protetoras. Outras seis espécies do gênero *Encholirium* e duas de *Dyckia* não apresentaram efeito negativo na porcentagem de germinação das sementes após a imersão em nitrogênio líquido sem utilização de crioprotetores (TARRÉ et al., 2007).

Dentre os métodos de criopreservação, a vitrificação é hoje o método mais utilizado para a preservação dos diferentes materiais biológicos, não exigindo equipamentos específicos, o que diminui seu custo, além de apresentar alta taxa de restabelecimento do material congelado (VATJA et al., 1998; KUWAYAMA et al., 2005). Este método apresenta como princípio a alta concentração de substâncias, fazendo com que a célula passe para um estado vítreo antes que os cristais de gelo sejam formados no seu interior, diminuindo a formação dos mesmos (SARAGUSTY; ARAV, 2011).

Tendo isto em vista, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a influência de diferentes soluções crioprotetoras na criopreservação em nitrogênio líquido de sementes das espécies de bromélias brasileiras ameaçadas de extinção *D. brevifolia* e *D. delicata*.

### **3.4 MATERIAL E MÉTODOS**

O experimento foi realizado no Departamento de Agronomia da Universidade Estadual de Londrina (UEL). Sementes de *Dyckia brevifolia* Baker e *Dyckia delicata* Larocca & Sobral. foram coletadas de plantas matrizes (Figura 3.4.1 e 3.4.2) na propriedade do colecionador Sr. Walter Miguel Kranz, localizada no município de Londrina/PR.

**Figura 3.4.1** - Detalhe da planta (A), inflorescência (B) e sementes (C) de *Dyckia brevifolia*.



**Fonte:** o próprio autor

**Figura 3.4.2** - Detalhe da planta (A), inflorescência (B) e sementes (C) de *Dyckia delicata*.



**Fonte:** o próprio autor

As sementes foram extraídas manualmente de cápsulas maduras e armazenadas em sacos de papel a  $10 \pm 2^\circ\text{C}$  durante duas semanas. Para a caracterização do lote, após a coleta das sementes, foi determinado o teor de água bem como a viabilidade das sementes pelo teste de tetrazólio, ambos seguindo as especificações das Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

Para obtenção do teor de água, 0,2 g de sementes de cada espécie foram colocadas em estufa a  $105 \pm 3^\circ\text{C}$  durante 24 horas. Na realização do teste de tetrazólio, foram utilizadas 4 repetições de 50 sementes cada. Para cada espécie, as sementes foram colocadas em criotubos (2 mL) e adicionada água destilada, sendo mantidas por 24 horas a  $25^\circ\text{C}$  em câmara de germinação. Em seguida, a água foi retirada e adicionada solução de sal de tetrazólio a 1%, e as sementes mantidas em B.O. D na ausência de luz, por 24 horas, a  $30^\circ\text{C}$ . Após este período, foi avaliada a porcentagem de sementes viáveis com o auxílio de uma lupa. Para o cálculo da porcentagem de sementes viáveis não foram consideradas as sementes vazias, ou seja, que não apresentavam embrião.

Para a montagem dos tratamentos, as sementes foram colocadas em criotubos com capacidade para 2 mL, e utilizados 4 criotubos com 50 sementes por tratamento para cada espécie avaliada. Os tratamentos consistiram de: glicerol 1M; glicerol 2 M; sacarose 0,4M; sacarose 0,8M; PVS1; PVS2; PVS2 + 1% floroglucinol e PVS3, além de um tratamento onde as sementes foram imersas em nitrogênio líquido sem adição de substâncias crioprotetoras. Também foi utilizado um controle, sem a adição de crioprotetores nem a imersão em nitrogênio líquido.

A solução de PVS1 é composta por 19% de glicerol (v/v), 13% de etileno glicol (v/v), 6% de dimetilsulfóxido (v/v) e sorbitol 0,5 M, diluído em meio MS (MURASHIGE;SKOOG,1962) modificado com a metade da concentração de macronutrientes. A solução de PVS2 contém 30% de glicerol (v/v), 15% de etileno glicol (v/v), 15% de dimetilsulfóxido (v/v) e sacarose 0,4 M, diluído em meio MS com metade da concentração de macronutrientes, e a solução PVS3 é composta por 50% glicerol (v/v) e 50% sacarose (v/v) diluído em água destilada. Todas as soluções foram preparadas em volume de 100 mL.

No tratamento controle, as sementes foram armazenadas dentro de criotubos a  $10 \pm 2^\circ\text{C}$ , até serem colocadas em câmara de germinação. No tratamento sem proteção, as sementes foram imersas em nitrogênio líquido sem adição de substância crioprotetora. Os demais tratamentos foram constituídos da adição de 2 mL das diferentes soluções crioprotetoras nos criotubos, com auxílio de uma pipeta de Pasteur.

Os tratamentos com glicerol 1M, glicerol 2M, sacarose 0,4M e sacarose 0,8M ficaram expostos às soluções por 20 minutos a temperatura ambiente ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ), e na sequência mergulhados em nitrogênio líquido. Nos tratamentos com PVS1, PVS2, PVS2 + 1% floroglucinol e PVS3 as sementes com as soluções ficaram por 10 minutos em banho de gelo ( $0^\circ\text{C}$ ), e em seguida mergulhadas em nitrogênio líquido.

Os criotubos permaneceram armazenados em nitrogênio líquido ( $-196^\circ\text{C}$ ) durante 15 dias. Após a retirada das sementes, foi realizado o descongelamento rápido em aparelho banho-maria da marca Evlab®, modelo EV: 015 com precisão de  $0,1^\circ\text{C}$ , à temperatura de  $40^\circ\text{C}$  durante 1 minuto e meio. As soluções crioprotetoras foram removidas dos criotubos com o auxílio de uma pipeta de Pasteur. Em seguida, as sementes foram lavadas com água autoclavada por três vezes e posteriormente submetidas ao teste de germinação. Antes da realização do teste, as sementes foram desinfetadas em solução de hipoclorito de sódio 1% durante 1 minuto e posteriormente lavadas com água autoclavada.

O teste de germinação foi conduzido sobre papel germitest umedecido com água destilada na quantidade de 2,5 vezes a massa do papel não hidratado, e as sementes acondicionadas em caixas de poliestireno cristal (Gerbox<sup>®</sup>) de dimensões 11 cm x 11 cm x 3 cm. Foram utilizadas 50 sementes por caixa e quatro repetições por tratamento, mantidas em câmara de crescimento (tipo B.O.D.) à temperatura de  $25 \pm 2$  °C, sob luz constante, conforme recomendações das Regras de Análise de Semente para outras espécies de sementes pequenas.

O teste de germinação se procedeu a partir do 3° dia da sementeira até o 10° dia. A porcentagem de germinação foi quantificada computando-se todas as plântulas normais (BRASIL, 2009). Foram consideradas como normais as plântulas que mostraram potencial para continuar seu desenvolvimento e dar origem a plantas quando desenvolvidas sob condições favoráveis. Considera-se que uma plântula normal tenha a proporção de 1:2 (uma parte de parte área para duas partes de raiz).

Simultaneamente ao teste de germinação, foi realizada a contagem do número de sementes germinadas, para estabelecer o índice de velocidade de germinação (IVG), obtido através da fórmula descrita por Maguire (1962).  $IVG = G1/N1 + G2/N2 + \dots + Gn/Nn$ , em que: G1, G2 e Gn = número de plântulas normais, computadas na primeira, segunda e última contagem; N1, N2, Nn = número de dias de sementeira à primeira, segunda e última contagem.

Ao 10° dia do teste de germinação, foram determinados os percentuais de germinação e de plântulas anormais, e o resultado expresso em porcentagem, além da determinação do comprimento das plântulas (mm) com o auxílio de um paquímetro, através da seleção aleatória de vinte plântulas. Posteriormente, foi determinada a massa seca das plântulas, que foram colocadas em sacos de papel e mantidas em estufa com circulação forçada de ar a 65 °C, até atingirem massa constante (período de cinco dias). As plântulas foram pesadas em balança analítica (precisão  $\pm 0,0001$ g), e o resultado expresso em miligrama.

Ao final do teste de germinação, foi realizada a aclimatização das plântulas, e as mesmas permaneceram em câmara de crescimento por trinta dias. Posteriormente, foram selecionadas aleatoriamente dez plântulas por tratamento e transplantadas para bandejas de polipropileno com 200 células, utilizando Carolina Soil<sup>®</sup> como substrato. As plantas foram mantidas em casa de vegetação climatizada, modelo Van der Hoeven<sup>®</sup> coberta com placas de policarbonato transparente e difusor, com retenção luminosa de 50%, através de tela de sombreamento Aluminet<sup>®</sup> e temperatura controlada de  $28^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ . A irrigação foi manual, adicionando uma lâmina de água de 6 mm, diariamente, no período da manhã. Após 180 dias

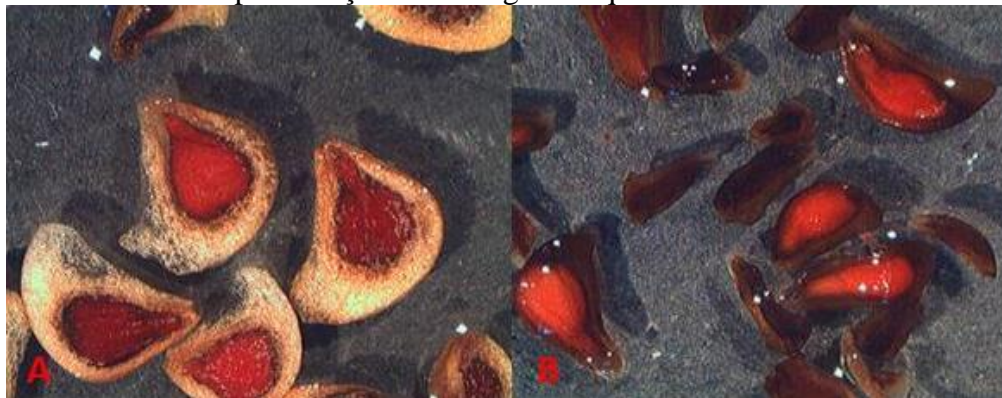
foram avaliados o comprimento da parte aérea, do sistema radicular (cm) considerando o comprimento da maior raiz, além da determinação de massa de seca da parte aérea e radicular (mg).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado e os pressupostos de normalidade e homogeneidade de variâncias foram testados por Shapiro-Wilk e Hartley ( $p < 0,05$ ) respectivamente, e posteriormente submetidos à análise de variância ( $p < 0,05$ ). Os dados foram processados utilizando o software R (R CORE TEAM, 2018), e submetidos ao teste de Tukey considerando um nível de significância de 5% de probabilidade de erro.

### 3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As sementes de *Dyckia brevifolia* e *Dyckia delicata*, apresentavam, respectivamente, 6,8% e 8,9% de teor de água e 98% e 94% de viabilidade (Figura 3.5.1) antes de passar pelo processo de criopreservação.

**Figura 3.5.1** - Sementes de *Dyckia brevifolia* (A) e *Dyckia delicata* (B) submetidas ao teste de tetrazólio antes da criopreservação em nitrogênio líquido.



**Fonte:** o próprio autor

O baixo teor de água presente nas sementes é fator fundamental para sua sobrevivência após serem retiradas do nitrogênio líquido (STEGANI et al., 2017), e este é um dos principais fatores que influênciam o processo da criopreservação (WALTERS; WHEELER; STANWOOD, 2004). Para as espécies estudadas, o teor de água está de acordo com a recomendação de Silva et al. (2011), que recomendam um teor abaixo de 10%, porém, o intervalo de umidade ideal para o congelamento difere entre as espécies.

A criopreservação torna-se uma alternativa para o armazenamento do material biológico por prazo indeterminado, sendo vantajoso por se tratar de um método simples e eficiente quando comparado aos tradicionais métodos de preservação (VENDRAME et al., 2014).

Dentre os materiais utilizados, as sementes possuem vantagem em relação à sobrevivência e regeneração quando criopreservadas, uma vez que a desidratação e congelamento ocorrem de forma mais rápida e uniforme, por ser um material jovem e de tamanho reduzido, que apresentam células pequenas e citoplasma denso com poucos vacúolos, o que significa pouca água livre disponível para o congelamento (SANTOS, 2002).

Para *Dyckia brevifolia* a porcentagem de germinação permaneceu alta após a criopreservação, variando de 87 a 94%, não havendo diferença estatística entre os tratamentos (Tabela 3.5.1).

**Tabela 3.5.1** - Porcentagem de germinação (GERM) e plântulas anormais (PA), índice de velocidade de germinação (IVG), comprimento (CP) e massa seca de plântulas (MSP) de *D. brevifolia*. Londrina/PR, 2018.

Tratamentos	GERM (%)	PA (%)	IVG	CP (mm)	MSP (mg)
Sem crioprotetor e sem nitrogênio líquido	95 a*	1 a	6,68 a	6,59 a	3,73 a
Sem crioprotetor	92 ab	3 a	6,83 a	6,26 ab	3,22 abcd
Glicerol 1M	88 ab	2 a	7,04 a	5,83 ab	3,04 bcd
Glicerol 2M	87 b	2 a	2,81 b	5,85 ab	2,98 cd
Sacarose 0,4M	93 ab	2 a	7,11 a	6,01 ab	3,54 ab
Sacarose 0,8M	87 b	4 a	7,04 a	5,78ab	2,74 d
PVS1**	91 ab	3 a	6,83 a	5,95 ab	3,41 abc
PVS2**	91 ab	5 a	6,88 a	5,72 b	3,27 abcd
PVS2 + 1% F**	94 ab	1 a	7,68 a	6,12 ab	3,47 abc
PVS3 <sup>3</sup>	88 b	2 a	6,20 a	6,00 ab	3,18 bcd
CV (%)	3,34	72,97	10,31	5,65	6,86

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

\*\*PVS1 [19% de glicerol (v/v), 13% de etileno glicol (v/v), 6% de dimetilsulfóxido (v/v) e sorbitol 0,5 M, diluído em ½ meio MS]; PVS2 [30% de glicerol (v/v), 15% de etileno glicol (v/v), 15% de dimetilsulfóxido (v/v) e sacarose 0,4 M, diluído em ½ meio MS]; PVS2 + 1% floroglucinol e PVS3[50% glicerol (v/v) e 50% sacarose (v/v) diluído em água destilada]. **Fonte:** o próprio autor.

No tratamento sem passar pelo processo de criopreservação, a porcentagem de germinação foi de 95% para *D. brevifolia*. Segundo Nikishina et al. (2007), as taxas de germinação de sementes após sua exposição ao nitrogênio líquido variam conforme a espécie, e podem ser menores ou maiores do que no controle, sendo a eficiência dos crioprotetores variável em função da estrutura (célula ou tecido) a ser criopreservada, além do tipo, concentração e tempo de exposição utilizado antes do processo de criopreservação.

O índice de velocidade de germinação (IVG) foi menor com a utilização de glicerol 2M (2,81), sendo inferior aos demais tratamentos, o que pode indicar um efeito tóxico deste nas sementes. Em trabalhos encontrados na literatura, foi relatado resultados no qual o glicerol pode afetar a organização citoplasmática e alterar a permeabilidade e estabilidade da bicamada lipídica (HAMMERSTEDT; GRAHAM, 1992).

Em relação às variáveis porcentagem de plântulas anormais (PA), comprimento (CP) e massa seca de plântulas (MSP) em comparação com os tratamentos testados, os mesmos apresentaram o mesmo comportamento, não evidenciando um melhor tratamento.

Também foram realizados estudos com sementes das espécies *Encholirium heloisae*, *E. pedicellatum*, *E. magalhaesii*, *E.reflexum*, *E. subsecundum*, *E. scrutor*, *Dyckia sordida* e *D. ursina*, em que Tarré et al. (2007), relataram não haver efeito negativo na porcentagem de germinação, quando as mesmas foram imersas em nitrogênio líquido.

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

Pereira et. al (2010), trabalhando com a bromélia *Pitcairnia albiflos* mantiveram a viabilidade por um ano das sementes com 5-7% de teor de água após o processo de criopreservação (-196°C), mas observaram que o teor de água em 3% teve um efeito prejudicial na longevidade das sementes.

As sementes de *D. delicata* apresentaram resposta semelhante (Tabela 3.5.2), não apresentando um melhor tratamento a ser utilizado durante o processo de congelamento.

**Tabela 3.5.2** - Porcentagem de germinação (GERM) e plântulas anormais (PA), índice de velocidade de germinação (IVG), comprimento (CP) e massa seca de plântulas (MSP) de *D. delicata*. Londrina/PR, 2018.

Tratamentos	GERM (%)	PA (%)	IVG	CP (mm)	MSP (mg)
Sem crioprotetor e sem nitrogênio líquido	92 a *	1 b	4,06 a	6,23 a	9,26 a
Sem crioprotetor	79 b	5 a	2,13 b	5,32 b	5,97 f
Glicerol 1M	86 ab	4 ab	3,46 ab	5,42 ab	7,68 bc
Glicerol 2M	82 ab	5 ab	4,28 a	5,75 ab	7,53 bc
Sacarose 0,4M	88 ab	3 ab	4,09 a	6,18 ab	6,24 ef
Sacarose 0,8M	87 ab	4 ab	4,04 a	6,10 ab	8,01 b
PVS1**	87 ab	2 ab	4,31 a	5,54 ab	7,94 b
PVS2**	86 ab	3 ab	3,94 ab	5,94 ab	6,70 de
PVS2 + 1% F**	88 ab	2 ab	4,59 a	6,04 ab	8,96 a
PVS3**	86 ab	2 ab	4,17 a	5,59 ab	7,13 cd
CV (%)	7,48	57,51	19,33	6,95	3,93

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

\*\*PVS1 [19% de glicerol (v/v), 13% de etileno glicol (v/v), 6% de dimetilsulfóxido (v/v) e sorbitol 0,5 M, diluído em ½ meio MS]; PVS2 [30% de glicerol (v/v), 15% de etileno glicol (v/v), 15% de dimetilsulfóxido (v/v) e sacarose 0,4 M, diluído em ½ meio MS]; PVS2 + 1% floroglucinol e PVS3[50% glicerol (v/v) e 50% sacarose (v/v) diluído em água destilada]. **Fonte:** o próprio autor.

O percentual de germinação na testemunha foi de 92%, diferindo apenas do tratamento submetido ao congelamento sem crioprotetor. O teor mais alto de água presente nas sementes de *D. delicata* em comparação com *D. brevifolia* pode ter levado a uma redução na qualidade das sementes após o processo de criopreservação quando não utilizados os crioprotetores. Não houve diferença na germinação entre os demais tratamentos, com variação de 79% para o tratamento submetido ao nitrogênio líquido sem proteção e de 88% para o tratamento com PVS2+1%F.

Na variável porcentagem de plântulas anormais (PA), o tratamento sem crioprotetor apresentou destaque em comparação aos outros tratamentos e diferiu significativamente da testemunha (sem crioprotetor e sem nitrogênio líquido).

Para o índice de velocidade de germinação (IVG), o tratamento sem crioprotetor não diferiu dos tratamentos com glicerol 1M e PVS2, apresentando diferença para os demais tratamentos. A testemunha apresentou melhores resultados para a variável comprimento de plântulas (CP) diferindo significativamente do tratamento sem crioprotetor.

A massa seca de plântula apresentou os maiores valores na testemunha (sem crioprotetor nem submetido a nitrogênio líquido) com 9,26 mg, não diferindo apenas do tratamento com a solução de PVS2+1%F (8,96 mg), apresentando estes maior massa seca em relação aos demais.

O fato das sementes das espécies estudadas manterem sua qualidade fisiológica quando em nitrogênio líquido (-196°C) é explicado por Stanwood e Roos (1979). De acordo com esses autores, sementes ortodoxas, como é o caso das espécies trabalhadas, podem ser desidratadas a um grau de umidade muito baixo sem a ocorrência de danos por congelamento ou por formação de cristais de gelo, e sem prejuízo à viabilidade.

As sementes de ambas as espécies apresentaram alta germinação e desenvolvimento inicial normal mesmo sem a utilização de crioprotetores (Figura 3.5.2).

**Figura 3.5.2** - Plântulas de *Dyckia brevifolia* (A) e *Dyckia delicata* (B) após 30 dias em câmara de germinação.



**Fonte:** o próprio autor

O baixo teor de água livre presente nas sementes foi fundamental para evitar a formação de cristais de gelo intracelular durante o congelamento, que poderiam causar a ruptura do sistema de endomembranas e resultar na perda da semipermeabilidade e da compartimentalização celular (KAVIANI et al., 2009).

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

Porém, observa-se que a utilização de crioprotetores também foi eficiente para a manutenção da viabilidade e do alto potencial germinativo. Isto se deve ao fato de que as ligações de hidrogênio entre os crioprotetores e a molécula de água diminuem a formação de cristais de gelo, além de promover a estabilização da estrutura quaternária das proteínas de membrana, preservando-as da desidratação (SAKAI, 1995).

Entretanto, esses crioprotetores, principalmente os intracelulares, podem ser tóxicos ou causar estresse osmótico, levando as células à morte ou modificando sua resposta morfogenética (SAKAI, 1995). Para isso, é sempre necessário ajustes em relação ao tipo de crioprotetor e o material vegetal em estudo, notando-se neste caso não haver um efeito tóxico para estas espécies.

Para poder garantir que as plântulas após o descongelamento tenham um desenvolvimento normal, estudos posteriores à germinação são essenciais. Os resultados indicaram que, após seis meses de cultivo, para ambas as espécies, não houve influência da adição ou não de substâncias crioprotetoras, e também não foi verificada alteração no desenvolvimento de raízes, parte aérea e massa seca entre os crioprotetores utilizados. Para todos os tratamentos, as mudas tiveram desenvolvimento satisfatório de suas partes (Tabela 3.5.3).

**Tabela 3.5.3** - Comprimento da parte aérea (CPA) e raiz (CR), massa seca da parte aérea (MSPA) e raiz (MSR) de *D. brevifolia* e *D. delicata* após 180 dias de cultivo em casa de vegetação. Londrina/PR, 2018.

<i>D. brevifolia</i>				
Tratamentos	CPA (cm)	CR (cm)	MSPA (mg)	MSR (mg)
Sem crioprotetor e sem nitrogênio líquido	3,64 a*	4,74 a	108,66 a	127,74 a
Sem crioprotetor	3,20 ab	4,82 a	104,30 a	118,04 ab
Glicerol 1M	2,90 b	4,87 a	84,82 a	99,14 ab
Glicerol 2M	2,86 b	4,80 a	103,28 a	99,66 ab
Sacarose 0,4M	2,95 b	4,87 a	93,94 a	84,82 ab
Sacarose 0,8M	2,97 b	4,73 a	86,40 a	79,96 ab

PVS1**	3,15 ab	5,05 a	85,30 a	76,02 ab
PVS2**	2,94 b	4,91 a	102,80 a	85,40 ab
PVS2 + 1% F**	3,18 ab	5,02 a	95,02 a	75,84 ab
PVS3**	2,82 b	4,91 a	99,38 a	75,30 b
CV (%)	9,71	5,42	22,13	26,77
<i>D. delicata</i>				
Sem crioprotetor e sem nitrogênio líquido	3,04 a *	5,25 a	114,08 a	88,16 a
Sem crioprotetor	3,10 a	5,13 a	110,08 a	77,28 a
Glicerol 1M	2,79 a	4,73 a	98,38 a	70,96 a
Glicerol 2M	2,89 a	4,78 a	86,36 a	65,82 a
Sacarose 0,4M	2,86 a	4,72 a	84,64 a	64,92 a
Sacarose 0,8M	2,83 a	4,69 a	82,56 a	66,42 a
PVS1**	3,06 a	5,09 a	97,32 a	69,94 a
PVS2**	2,87 a	5,07 a	107,22 a	65,98 a
PVS2 + 1% F**	2,97 a	5,06 a	104,48 a	68,98 a
PVS3**	2,85 a	4,91 a	97,08 a	66,82 a
CV (%)	5,08	6,46	18,18	19,30

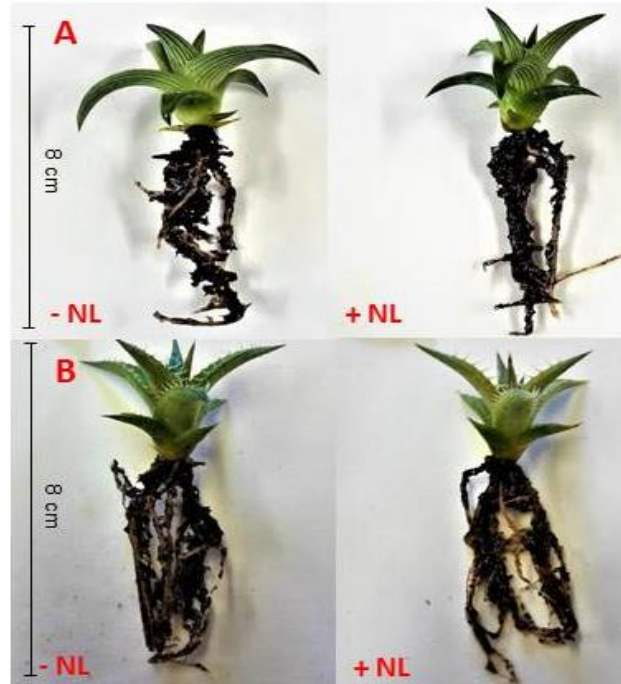
\*Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

\*\*PVS1 [19% de glicerol (v/v), 13% de etileno glicol (v/v), 6% de dimetilsulfóxido (v/v) e sorbitol 0,5 M, diluído em ½ meio MS]; PVS2 [30% de glicerol (v/v), 15% de etileno glicol (v/v), 15% de dimetilsulfóxido (v/v) e sacarose 0,4 M, diluído em ½ meio MS]; PVS2 + 1% floroglucinol e PVS3[50% glicerol (v/v) e 50% sacarose (v/v) diluído em água destilada]. **Fonte:** o próprio autor.

As sementes de ambas as espécies mostraram não haver necessidade de utilizar crioprotetores durante o congelamento (Figura 3.5.3), onde se pode observar o desenvolvimento das plântulas de *D. brevifolia* (A) e *D. delicata* (B) nos tratamentos com e sem aplicação de nitrogênio líquido.

Com isso, torna-se viável a aplicação da técnica de criopreservação de maneira simples e a baixo custo, visto que não há necessidade da utilização destas soluções (STEGANI et al., 2017).

**Figura 3.5.3** - Desenvolvimento de plantas de *Dyckia brevifolia* (A) e *Dyckia delicata* (B) após 180 dias submetidos (+NL) ou não (-NL) a criopreservação em nitrogênio líquido.



**Fonte:** o próprio autor

### 3.6 CONCLUSÃO

O uso de crioprotetores não prejudicou a viabilidade das sementes. As sementes de *Dyckia brevifolia* com 6,8% de teor de água e *Dyckia delicata* com 8,9% podem ser criopreservadas em nitrogênio líquido sem a necessidade de soluções crioprotetoras.

### 4 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A partir desta pesquisa foi possível conhecer e entender a importância das bromélias no meio ambiente e dos riscos que muitas espécies estão de desaparecer da natureza.

Através da técnica da criopreservação foi possível encontrar uma forma de se preservar as sementes de *Dyckia delicata* e *Dyckia brevifolia* sem o uso de substâncias protetoras. As sementes apresentaram um alto poder germinativo e manutenção da sua viabilidade após o congelamento, além das mudas apresentarem um desenvolvimento normal após o processo de criopreservação.

Outros estudos envolvendo mecanismos de proteção destas sementes durante o congelamento e análises mais detalhadas após o descongelamento devem ser realizadas para estas espécies.

## 5 REFERÊNCIAS

- AB'SABER, A.N. **Os domínios de natureza no Brasil: Potencialidades Paisagísticas**. São Paulo: Ateliê Editorial, 2003.
- ALBA, R.P.R.; RAFAELA C. F.; ANTONIO, C.S.A. Physiological characteristics underpinning successful cryopreservation of endemic and endangered species of Bromeliaceae from the Brazilian Atlantic Forest. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 176, n24, p.567-578, 2014.
- ALI, J.; SHELTON, J.N. Vitrification of pre implantation stages of mouse embryos. **Journal of Reproduction and Infertility**, v. 98, n.2, p.459-465, 1993.
- AMANN, R.P.; PICKETT, B.W. Principle of cryopreservation and a review of stallion spermatozoa. **Equine Veterinary Science**, v.7, n.3, p.145-174, 1987.
- ARAV, A.; ZERON, Y.; TOMCZAK, M.; CROWE, J. The effect of liposomes on thermotropic membrane phase transitions of bovine spermatozoa and oocytes: implications for reducing chilling sensivity. **Cryobiology**, v.45, p. 143-152, 2002.
- BAJAJ, Y.P.S. Cryopreservation of plant cell, tissue, and organ culture for the conservation of germplasm and biodiversity. **Biotechnology in Agriculture and Forestry**, v.32, p. 3-28, 1995.
- BALABAN, B.; URMAN, B.; ATA, B.; ISIKLAR, A.; LARMAN, M.G.; HAMILTON, R.; GARDNER, D.K. A randomized controlled study of human day 3 embryo cryopreservation by slow freezing or vitrification: vitrification is associated with higher survival, metabolism and blastocyst formation. **Human Reproduction**, v. 23, n. 9, p.1976-1982, 2008.
- BARBOSA, J.F.; SANVITTO, L.C. Crioterapia Local (Criocirurgia) – Denominação e Histórico. **Boletim de Oncologia**, v. 3, n. 3-4, p.29-34, 1973.
- BARBOSA-FILHO, W. G; ARAUJO, A. C. **Eficiência de polinização e biologia reprodutiva de Bromélia balansae Mez (Bromeliaceae) em um fragmento de Cerrado, Mato Grosso do Sul**. 2007. Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil, Caxambu-MG.
- BARFUSS, M.H.J.; SAMUEL, R.; TILL, W.; STUESSY, T.F. Phylogenetic relationships in subfamily Tillandsioideae ( Bromeliaceae) based on DNA sequence data from seven plastid regions. **American Journal of Botany**, v. 92, p. 337-351, 2005.
- BATISTA, P.S. **Análise de efeito do spray de nitrogênio líquido em culturas de bactérias Enterococcus faecalis – Estudo in Vitro**. 2006. 97p. Tese (Doutorado em Odontologia). Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.
- BENSON, E.E.; BREMNER, D. Oxidative stress in the frozen planet: a free radical point of view. In: FULLER, B.J.; LANE, N.; BENSON, E.E. **Life in the Frozen State**, p.206-241, 2004.

- BENSON, E.E.; JOHNSTON, J.; MUTHUSAMY, J.; HARDING, K. Physical and engineering perspectives of in vitro plant cryopreservation. **Plant tissue culture engineering**, v. 6, p. 441-476, 2008.
- BENZING, D.H. **The biology of the bromeliads**. Califórnia: Eureka, 1980. 305p.
- BENZING, D.H. **Bromeliaceae: Profile of an Adaptive Radiation**. Cambridge: Universit Press, 2000. 690p.
- BERED, F.; SANTOS, K.E.; PALMA, S.C.; PAGGI, G.M. Bromélias - A beleza exótica do Novo Mundo. In: BARBIERI, R.L. STUMPF, E.R.T (eds). **Origem e evolução de plantas cultivadas**. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, p. 235-251, 2008.
- BERJAK, P.; PAMMENTER, N.W. What ultrastructure has told us about recalcitrant seeds. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.12, p.22-55, 2000.
- BERNARDELLO, G.; GALETTO, L.; JULIANI, H.R. Nectar and nectary structure in some Argentinean Bromeliaceae. **Annals of Botany**, v. 67, p. 401-411, 1991.
- BEWLEY, J.D.; BLANCK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. 2.ed. New York: Plenum Press, 1994. 445p.
- BRASIL. Ministério do meio ambiente. **Instrução Normativa MMA nº 6/2008. Lista Oficial das Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção**. 2008. Disponível em: <[http://www.mma.gov.br/estruturas/179/\\_arquivos/179\\_05122008033615.pdf](http://www.mma.gov.br/estruturas/179/_arquivos/179_05122008033615.pdf)>. Acesso em: 16.jun.2018.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília : Mapa/ACS, 2009. 399p.
- BUZATO, S.; SAZIMA, M.; SAZIMA, I. Hummingbird-pollinated floras at three Atlantic Forest sites. **Biotropica**, v.32, p.824-841, 2000.
- CATHCART, D.J. The importance of maintaining bromeliad imports. **Florida Entomologist**, v. 78, n. 1, p. 16-21, 1995.
- CHIAN, R.C.; KUWAYAMA, M.; TAN, L.; KATO, O.; NAGAI, T. High survival rate of bovine oocytes matured in vitro following vitrification. **Journal of Reproduction and Development**, v.50, n. 6, p. 685-696, 2004.
- CHWEE, C.P.; AHMAD, I. An overview of the world production and marketing of tropical and subtropical fruits. **Acta Horticulturae**, v.787, p. 47-58, 2008.
- CNCFlora. **Dyckia delicata in Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012.2. Centro Nacional de Conservação da Flora**. 2012. Disponível em: [http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Dyckia delicata](http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Dyckia%20delicata). Acesso em: 24 jun.2018.
- CONSEMA - Conselho Estadual do meio ambiente, Rio Grande do Sul. Decreto estadual n. 42.099 de 31 de dezembro de 2002. **Declara as espécies da flora nativa ameaçadas de extinção no estado do Rio Grande do Sul e da outras providências**. Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 2002.

- CRAYN, D.M.; RANDALL, G.T.; SMITH., J.A.C.; WINTER, K. Molecular systematics investigations in Pitcairnioideae (Bromeliaceae) as a basis for understanding the evolution of crassulacean acid metabolism (CAM). In: Karen L. Wilson; David A Morrison (Orgs). **Monocots: systematic and evolution**. Melbourne: CSIRO, 2000. p.569-579.
- CRONQUIST, A. **The evolution and classification of flowers plants**. 2. ed. New York: Botanic Garden, 1988. 555p.
- CROWE, J.H.; CROWE, L.M.; CARPENTER, J.F. Stabilization using dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.242, p. 1-10, 1987.
- DALIMATA, A.M.; GRAHAM, J.K. Criopreservation of rabbit spermatozoa using acetamide in combination with trehalose and methyl cellulose. **Theriogenology**, v.48, p. 831-841, 1997.
- DAY, J.G.; HARDING, K.C.; NADARANJAN, J.; BENSON, E.E. Molecular biometrics handbook: conservation of bioresources at ultra low temperatures. **Humana Press**, p. 917 - 947, 2008.
- DELCLARO, K. Origens e importância das relações plantas-animais para a ecologia e conservação. In: SILINGARDI, T.; MAURA, H. (Orgs). **Ecologia das Interações Plantas-Animais: Uma Abordagem Ecológico-Evolutiva**. Rio de Janeiro: Technical Books, 2012. 336p.
- DENNISTON, R. S.; MICHELET, S.; GODKE, R. Principles of cryopreservation. In: TIERSCH, T.R.; MAZIK, P.M. Cryopreservation in aquatic species. **World Aquaculture Society**, p. 59-74, 2000.
- DEREUDDRE, J. ; DESBRUNAIS, A.B. ; BRISON, M. ; BOUCAUD, M. ; ENGELMANN.; PAUL, H. ; PAULUS, V. ; NOREEL, B.S. ; SCOTTEZ, C. Cryoconservation d'apex et d'embryons somatiques d'arbres fruitiers. **Genetics Selection Evolution**, n.1, v.26, p. 279-290, 1994.
- DITTRICH, V.A.O.; KOZERA, C.; SILVA, M.S. Levantamento florístico dos epífitos vasculares do Parque Barigui, Curitiba, Paraná, Brasil. **Série Botânica**, n. 52, p. 11-21. 1999.
- DOBRINSKI, J.R.; PURSEL, V.G.; LONG, C.R.; JOHNSON, L.A. Birth of piglets after transfer of embryos cryopreserved by cytoskeletal stabilization and vitrification. **Biology of Reproduction**, v. 62, n. 3, p.564-570, 2000.
- DUMET, D.; ENGELMANN, F.; CHABRILLANGE, N.; DUVAL, Y.; DEREUDDRE, J. Importance of sucrose for the acquisition of tolerance to desiccation and cryopreservation of oil palm somatic embryos. **Cryo-Letters**, v.14, p. 243-250, 1993.
- ENGELMANN, F. Importance of desiccation for the cryopreservation of recalcitrant seed and vegetatively propagated species. **Plant Genetic Resources Newsletter**, v.112, p.9-18, 1997.
- ENGELMANN, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. **In Vitro Cellular and Development Biology -Plant**, v. 47, p. 5-16, 2011.

ENGLAND, G. C. W. Cryopreservation of dog semen: a review. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 47, p.243-255, 1993.

ENGLERT, S. I. **Orquídeas & bromélias: manual prático de cultivo**. Guaíba: Agropecuária, 2000. 96p.

ESTEVAN, D.A. **Bromeliaceae da região nordeste do estado do Paraná, Brasil**. 2010. 58p (Tese de Doutorado em Agronomia). Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

FAHY, G.M. The relevance of cryoprotectant "toxicity" to cryobiology. **Cryobiology**, v. 23, p. 1-13, 1986.

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

FERRARI, E.A.P.; COLOMBO, R.C.; FARIA, R.T.; TAKANE, R.J. Cryopreservation of seeds of *Encholirium spectabile* Martius ex Shultes f. by the vitrification method. **Revista Ciência Agronômica**, v.47, n.1, p .172-177, 2016.

FISCHER, E.A. **Polinização, fenologia e distribuição espacial de Bromeliaceae numa comunidade de Mata Atlântica, litoral sul de São Paulo**. 1994. 80p. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1994.

FLORIANO, E.P. **Armazenamento de sementes florestais**. Santa Rosa: ANORGS, 2004. 10p.

FONTOURA, T; COSTA, A.; WENDT, T. Preliminary checklist of the Bromeliaceae of Rio de Janeiro State, Brazil. **Selbyana**, v.12, p.5-45, 1991.

FORZZA, R. C. **Filogenia da tribo Puyeeae Wittm. e revisão taxonômica do gênero Encholirium Mart. ex Schult. & Schult. f. (Pitcairnioideae-Bromeliaceae)**. 2001. 208p. (Tese de Doutorado em Biologia). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

FORZZA, R.C. **Relatório Dyckia distachya**. Relatório do Jardim Botânico do Rio de Janeiro para o Ministério do Meio Ambiente, 2005. Disponível em: [www.apremavi.org.br/download.php?codigoArquivo=48](http://www.apremavi.org.br/download.php?codigoArquivo=48). Acesso em: 21 jun.2018.

FORZZA, R. C.; COSTA, A.; SIQUEIRA FILHO, J. A.; MARTINELLI, G. **Dyckia in Lista de Espécies da Flora do Brasil, Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2011. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2011/FB006046>. Acesso em: 21 jun. 2018.

FZB/RS. Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul. **Avaliação do Estado de Conservação de Espécies Flora -RS**. 2014. Disponível em:<<http://www.fzb.rs.gov.br>>. Acesso em: 22. jun.2018.

GIULIETTI, A.M.; RAPINI, A.; ANDRADE, M.J.G.; QUEIROZ, L.P.; SILVA, J.M.C. **Plantas raras do Brasil**. Belo Horizonte: Conservação Internacional, 2009. 433p.

GIVNISH, T.J.; BARFUSS, M.H.J.; VAN, E.E.B.; RIINA, R.; SCHULTE, K.; HORRES, R.; GONSISKA, P.A.; JABAILY, R.S.; CRAYN, D.M.; SMITH, A.C.; WINTER, K.; BROWN, G.K.; EVANS, T.M.; HOLST, B.K.; LUTHER, H.; TILL, W.; ZIZKA, G.; BERRY, P.E.; SYTSMA, K.J. Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography in bromeliaceae: insights from an eight-locus plastid phylogeny. **American Journal of Botany**, v. 98, n. 5, p. 1-24, 2011.

GIVNISH, T.J.; BERRY, P.E.; SYTSMA, K.J. Phylogeny, adaptive radiations, and historical biogeography of Bromeliaceae inferred from *ndhF* sequence data. In: COLUMBUS, J.T.; FRIAR, E.A.; PORTER, J.M.; PRINCE, L.M.; SIMPSON, M.G. (Eds.). **Monocots: Comparative Biology and Evolution- Poales**. Claremont: Rancho Santa Ana Botanic garden, 2007. p.3-26.

GIVNISH, T.J.; MILLAM, K.C.; EVANS, T.M.; HALL, J.C.; PIRES, J.C.; BERRY, P.E.; SYTSMA, K.J. Ancient vicariance or recent long-distance dispersal? Inferences about phylogeny and South American-African disjunctions in Rapateaceae and Bromeliaceae based on *ndhF* sequence data. **International Journal of Plant Science**, v.165, p.35-54, 2004.

GOLDFARB, M.; DUARTE, M.E.M.; MATA, M.E.R.M.C. Armazenamento criogênico de sementes de pinhão manso (*Jatropha curca* L.) Euphorbiaceae. **Biotemas**, v.23, n.1, p. 27-33, 2010.

GONZÁLES-ASTORGA, J.; CRUZ-ANGÓN, A.; ALEJANDRO, FLORES-PALACIOS.; VOVIDES, A.P. Diversity and Genetic Structure of the Mexican Endemic Epiphyte *Tillandsia achyrostachys* E. Morr. ex Baker var. *achyrostachys* (Bromeliaceae). **Annals of Botany**, v. 94, n.4, p.545-551, 2004.

GOUDA, E.J.; BUTCHER, D.; GOUDA, C.S. **Encyclopaedia of bromeliads**. Dutch-Belgian Bromeliad Society (BCG), Utrecht. 2014. Disponível em: <http://encyclopedia.florapix.nl/>. Acesso em: 22 jun.2018.

GRANT, J. R.; ZIJLSTRA, G. An annotated catalogue of the generic names of the Bromeliaceae. **Selbyana**, v.19, p. 92-121, 1998.

GROOT, S.P.C.; SOEDA, Y.; STOOPEN, G.; KONINGS, M.C.J.M.; GEEST, A.H.M. van der. Gene expression during loss and regaining of stress tolerance at seed priming and drying. In: NICOLÁS, G.; BRADFORD, K.J.; CÔME, D.; PRITCHARD, H.D. (Ed.). **The biology of seeds: recent research advances**. Cambridge: CAB International, 2003. p.279-287.

HAMMERSTEDT R.H.; GRAHAM J.K. Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. **Cryobiology**, v.29, n.1, p. 26-38, 1992.

HAN X.; MAB L.; BENSON J.; BROWN A.; CRITSER J.K. Measurement of the apparent diffusivity of ethylene glycol in mouse ovaries through rapid MRI and theoretical investigation of cryoprotectant perfusion procedures. **Cryobiology**, v.58, p. 298-302, 2009.

HERINGER, H.; MONTENEGRO M.M. **Avaliação e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da Mata Atlântica e Campos Sulinos**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2000. 40p.

- HORRES, R.; ZIZKA, G.; KAHL, G.; WEISING, K. Molecular phylogenetics of Bromeliaceae: evidence from trnL (UAA) intron sequences of the chloroplast genome. **Plant Biology**, v. 2, p.306-315, 2000.
- HIRANO, T.; GODO, T.; MIYOSHI, K.; ISHIKAWA, K.; ISHIKAWA, M.; MII, M., Cryopreservation and low-temperature storage of seeds of *Phaius tankervilleae*. **Plant Biotechnology Reports**, v.3, p.103-109, 2009.
- HOEKSTRA, F.A.; GOLOVINA, E.A.; NIJSSE, J. What do we know about desiccation tolerance mechanism? In: NICOLÁS, G. et al. (Eds.). **The biology of seeds: recent research advances**. Cambridge: CAB International, 2003. p.259-70.
- HONG, T.D.; ELLIS, R.H. **A protocol to determine seed storage behaviour**. International Plant Genetic Resources Institute, 1991.55p.
- HONG, T.D.; LININGTON, S.; ELLIS, R.H. **Seed storage behaviour: a compendium**., Rome: Handbooks for Genebanks, 1996. 115p.
- JUNIOR, R.G.F. **Criopreservação, indução de poliploidia e avaliação da estabilidade genética de orquídeas**. 2013. 82p. (Tese de Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2013.
- JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F.; DONOGHUE, M. J. **Sistemática vegetal: um enfoque filogenético**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 612 p.
- KANG, K.A.; LEE, K.H.; CHAE, S.; ZHANG, R.; JUNG, M.S.; HAM, Y.M.; BAIK, J.S.; HYUN, Y.W. Cytoprotective effect of phloroglucinol on oxidative stress induced cell damage via catalase activation. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.97, p. 609-620, 2006.
- KARTHA, K.K. Meristem culture and germplasm preservation. In: Kartha, K.K. (Ed.) Cryopreservation of plant cells and organs. **Boca Raton**, p. 115-134, 1985.
- KAVIANI, B.; SAFARI-MOTLAGH, MR.; PADASHT-DEHKAEI, M.N.; DARABI, A.H.; RAFIZADEH, A. Cryopreservation of seeds of lily [*Lilium Iedebourii* (Baker) Bioss]: use of sucrose and dehydration. **African Journal of Biotechnology**, v.8, n.16, p. 3809-3810, 2009.
- KLEIN, R. M. Reófitas no Estado de Santa Catarina, Brasil. **Anais da Sociedade Botânica do Brasil**. 30º Congresso Nacional de Botânica, Campo Grande, p. 159-169, 1979.
- KOHOMA, S.; MALUF, A.M.; BILIA, D.A.C.; BARBEDO, C.J. Secagem e armazenamento de sementes de *Eugenia brasiliensis* Lam. (Grumixameira). **Revista Brasileira de Sementes**, v.28, n.1, 2006.
- KOSTER, K.L. Glass formation and desiccation tolerance in seeds. **Plant Physiology**, v.96, p. 302-304, 1991.
- KRANZ, W.M. **Dyckia (Bromeliaceae, Pitcairnioideae), um gênero relict**. 2013. In: 64º Congresso Nacional de Botânica, Belo Horizonte, Disponível em: <https://www.botanica.org.br/>. Acesso em: 20 jun.2018.

KRAPP, F., PINANGE, D., BENKO-ISEPPON, A. LEME, E.M.C.; WEISING, K. Phylogeny and evolution of *Dyckia* (Bromeliaceae) inferred from chloroplast and nuclear sequences. **Plant Systematics and Evolution**, v.9, p.591-614, 2014.

KUBITZKI, K. **The families and genera of vascular plants. Flowering plants. Monocotyledons. Alismatanae and Commelinanae (except gramineae)**. Berlin: Springer Verlag, 1998. 551p.

KULESHOVA, L.L.; LOPATA, A. Vitrification can be more favorable than slow cooling. **Fertility and Sterility**, v.78, n. 3, p. 449-454, 2002.

KUWAYAMA, M.; VAJTA, G.; IEDA, S.; KATO, O. Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and elimination of potential contamination. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 11, n. 5, p.608-614, 2005.

LAROCCA, J.; SOBRAL, M. *Dyckia delicata* (Bromeliaceae), a New Species from Rio Grande do Sul, Brasil. **Novon**, v.12, p.234-236, 2002.

LEME, M.C.E; MARINGO, L.C. **Bromélias na natureza**. São Paulo: Marigo Comunicação Visual, 1993. 183p.

LEME, E.M.C.; RIBEIRO, O.B.C.; MIRANDA, Z.J.G. New species of *Dyckia* (Bromeliaceae) from Brazil. **Phytotaxa**, v. 67, p. 9-37, 2012.

LEOPOLD, A.C. Coping with desiccation. In: ALSCHER, J.; CUMMING, J.R. (eds) *Plant Biolog. Stress responses in plants: adaptation and acclimation mechanisms*. **Wiley- Liss**, v.12, p.37-56, 1990.

LOVELOCK J.E.; BISHOP, M.W.H. Preservation of freezing damage to living cells by dimethyl sulfoxide. **Nature**, v.183, p. 1394-1395, 1959.

LUTHER, H.E. **An alphabetical list of bromeliad binomials**. 11. ed. Sarasota: Bromeliad Society and Marie Selby Botanical Garden, 2008. 110p.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop science**, v. 2, n. 2, p. 176-177, 1962.

MAKOWSKA, Z.; KELLER, J.; ENGELMANN, F. Cryopreservation of apices isolated from garlic (*Allium sativum* L.) bulbils and cloves. **Cryo Letters**, v.20, p.175-182, 1999.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: FEALQ, 2005. 495p.

MARTINELLI, G. Biologia reprodutiva de Bromeliaceae na Reserva Ecológica de Macaé de Cima. In: LIMA, H.C.; GUEDES-BRUNI, R.R. (Eds.). **Serra de Macaé de Cima: Diversidade florística e conservação em Floresta Atlântica**. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 1997. p.213-250.

MARTINELLI, G.; MORAES, M.A. Livro Vermelho da Flora do Brasil. 1. ed. - Rio de Janeiro : Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2013.1110p.

- MARTINELLI, G.; VIEIRA, C.M.; GONZALES, M.; LEITMAN, P.; PIRATININGA, A.; COSTA, A.F.; FORZZA, R.C. Bromeliaceae da Mata Atlântica Brasileira: Lista de espécies, distribuição e conservação. **Rodriguésia**, v.59, n.1, p.209-258, 2008.
- MARTINS, L.; LAGO, A.A.; ANDRADE, A.C.S.; SALES, W.R.M. Conservação de Sementes de ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa* (Mart. Ex DC.) Standl.) em nitrogênio líquido. **Revista Brasileira de Sementes**, v.31, n.2. p.71-76, 2009.
- MATSUMOTO, T.; SAKAI, A.; TAKAHASHI, C.; YAMADA, K. Cryopreservation in vitro grown apical meristems of wasabi (*Wasabi japonica*) by encapsulation vitrification method. **Cryo Letters**, v.16, p.189-206, 1995.
- MAZUR, P. Freezing injury in plants. **Annual Review Plant Physiology**, v.20, p.419-445, 1969.
- MAZUR, P. Fundamental aspects of the freezing of cells, with emphasis on mammalian ova and embryos. In: **International congress animal reproduction and artificial insemination**. Proceedings 9<sup>th</sup> Congress of Animal Reproduction, v.2, p. 99-114, 1980.
- MURARO, D. **Germinação em substratos alternativos ao xaxim e aspectos fenológicos e reprodutivos de *Vriesea incurvata* Gaudich.: subsídios à produção sustentável**. 2006. 66p. (Dissertação de Mestrado em Produção Vegetal) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.5, n.3, p. 473-497, 1962.
- NAIK, B.R.; RAO, B.S.; VAGDEVI, R.; GNANPRAKASH, M.; AMARNATH, D. & RAO, V.H. Conventional slow freezing, vitrification and open pulled straw (OPS) vitrification of rabbit embryos. **Animal Reproduction Science**, v.86, n.3-4, p.329-338, 2005.
- NERY, M.C.; DAVIDE, A.C.; SILVA, E.A.A.; SOARES, G.C.M.; NERY, F.C. Classificação fisiológica de sementes florestais quanto a tolerância à dessecação e ao armazenamento. **Cerne**, v.20, n.3, p.477-483, 2014.
- NEVES, P.R. **Utilização de Crioprotetores Intra e Extracelulares em embriões de Pacu (*Piaractus mesopotamicus*)**. 2008. 87p. (Tese de Doutorado em Zootecnia) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR, 2008.
- NEWTON, H.; FISHER, J.; ARNOLD, J.R.P.; PEGG, D.E.; DADDY, M.J.; GOSDEN, R.G. Permeation of human ovarian tissue with cryoprotective agents in preparation for cryopreservation. **Human Reproduction**, v. 13, p. 376-380, 1998.
- NIKISHINA, T.V.; POPOVA, A.E.V.; VAKHRAMEEVA, M.G.; VARLYGINA, T.I.; KOLOMEITSEVA, G.L.; BUROV, A.V.; POPOVICH, E.A.; SHIROKOV, A.I.; SHUMILOV, V.Y.U.; POPOV, A.S. Cryopreservation of seeds and protocorms of rare temperate orchids. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 54, p.121-127, 2007.
- NISHIZAWA, S.; SAKAI, A.; AMANO, Y.; MATSUZAWA, T. Cryopreservation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) embryogenic suspension cells and subsequent plant regeneration by vitrification. **Plant Science**, v.91, p.67-73, 1993.

O ECO. **Entenda a classificação da Lista Vermelha da IUCN**. 2014. Disponível em: <http://www.oeco.org.br/dicionario-ambiental/27904>. Acesso em: 13 jun.2018.

OLIVEIRA, R.R. Importância das bromélias epífitas na ciclagem de nutrientes da Floresta Atlântica. **Acta Botanica Brasílica**, v.18, n.4, p.793-799, 2004.

PARKS, E.J.; GRAHAM, J.K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v.38, p. 209-222, 1992.

PAULA, C. C. **Cultivo de bromélias**. Viçosa: UFV, 2000. 139p.

PAULA, C. C.; SILVA, H. M. P. **Cultivo Prático de Bromélias**. Viçosa: UFV, 2004. 116p.

PEGG, D. E. Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols Methods. Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols. **Humana Press Inc**, v. 368, p.39-57, 2007.

PEREIRA, A.R.; ANDRADE, A.C.S.; PEREIRA, T.S.; FORZZA, R.C.; RODRIGUES, A.S. Morphological aspects of seed, germination and storage of *Pitcairnia albiflos* (Bromeliaceae). **Seed Science and Technology**, v.38, n.1, p.79-87, 2010.

POLGE, C.; SMITH, A.U.; PARKERS, A.S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. **Nature**, v. 164, p.666-667, 1949.

R CORE TEAM. R. A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, 2011. Disponível em: <http://www.r-project.org>. Acesso em: 28 out.2018.

REFLORA. **Bromeliaceae in Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB66>. Acesso em: 07 Jun. 2018.

REITZ, R. **Bromeliáceas e a malária-bromélia endêmica**. Itajaí: Flora Ilustrada Catarinense, p.1-159, 1983. 518p.

ROBERTS, E.H. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science and Technology**, v. 1, p.499-514, 1973.

ROGALSKI, J.M. **Biologia da conservação da reófito *Dyckia brevifolia* Baker (Bromeliaceae) no Rio Itajaí Açu, SC**. 2007. 86p. (Tese de doutorado em Recursos de genética vegetal) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis/SC, 2007.

ROMERO, G.Q. **Associações entre aranhas Salticidae e Bromeliaceae: história natural, distribuição espacial e mutualismos**. 92p. 2005. ( Tese de Doutorado em Ecologia) - Universidade de Campinas, Campinas/SP, 2005.

RUBINSKY, B. Principles of low temperature cell preservation. **Heart Failure Reviews**, v.8, p. 277-284, 2003.

SACANDÉ, M.; JOKER, D.; DULLOO, M.E.; THOMSEN, K.A. **Comparative storage biology of tropical tree seeds**. Rome: IPGRI, 2004. 363p.

SAKAI, A. Cryopreservation of germplasm of woody plants. In: BAJAJ, Y.P.S. (Ed.) **Biotechnology in agriculture and forestry**, v.32, p. 53-69, 1995.

SAKAI, A. Proceedings of the International Workshop on Cryopreservation of Bio-Genetic Resources, International Technical Cooperation Center. **Rural Development Administration**, v. 1, p.3-18, 2003.

SAKAI, A. Survival of the twig of woody plants at  $-196^{\circ}\text{C}$ . **Nature**, v. 185, p. 392-394, 1960.

SAKAI, A.; KOBAYASHI, S.; OIYAMA, I. Cryopreservation of nucellar cell of navel orange (*Citrus sinensis* Obs. var. brasiliensis Tanaka) by vitrification. **Plant Cell**, v.9, p.30-33, 1990.

SAKAI, A.; LARCHER, W. Frost survival of plants - Responses and adaptation to freezing stress. **Springer**, v.62, 11p, 1987.

SANTOS, H.O. **Conservação de Sementes de Mamona (*Ricinus communis* L.)**. 2010. 85p. (Dissertação de Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras/MG, 2010.

SANTOS, I.R.I. Criopreservação: potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, p.70-84, 2000.

SANTOS, I.R.I. Criopreservação: potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.12, p. 70-84, 2002.

SANTOS, R. R.; AMORIM, C.CECCONI, S, FASSBENDER, M.; IMHOF, M.; LORNAGE, J.;PARIS, M.; SCHOENFELDT, V.; MARTINEZ-MADRID, B. Cryopreservation of ovarian tissue: an emerging technology for female germline preservation of endangered species and breeds. **Animal Reproduction Science**, v.122, p.151-163, 2010.

SARAGUSTY, J.; ARAV, A. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. **Reproduction**, v.141, p.1-19, 2011.

SEMA. Secretaria de Estado do Meio Ambiente. **Lista Vermelha de Plantas Ameaçadas de Extinção no Estado do Paraná**, Curitiba, 1995. 139p.

SILVA, A.R. Atualidades sobre a criopreservação do sêmen de cães. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, n.1, p. 119-127, 2007.

SILVA, A.R.; CARDOSO, R.C.S.; UCHOA, D.C.; SILVA, L.D.M. Quality of canine semen submitted to single or fractioned glycerol addiction during the freezing process. **Theriogenology**, v.59, p.821-829, 2003.

SILVA, M.T.B. **Relação da água e dos detritos com a riqueza de macroinvertebrados em bromélias**. Inpa. 2009. 9p.

SILVA, R.C.; CAMILLO, J.; LUIS, Z.G.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E. Potencial germinativo e morfoanatomia foliar de plântulas de pinhão- manso originadas de germoplasma criopreservado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.46, n.8, p.836-844, 2011.

SILVEIRA, A.A.C. **Criopreservação de ápices caulinares e micropropagação em condições heterotróficas e mixotróficas de *Eugenia dysenterica* (Mart.)**. 2015. 78p. (Dissertação de Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2015.

SIMIONE, F.P. **Thermo Scientific Nalgene and Nunc Cryopreservation Guide**. 2013. Disponível em : [http://www.atcc.org/~media/PDFs/Cryopreservation\\_Technical\\_Manual.ashx](http://www.atcc.org/~media/PDFs/Cryopreservation_Technical_Manual.ashx). Acesso em: 22 jun.2018.

SMITH, L.B. 1955. **The Bromeliaceae of Brazil**. Washington: Smithsonian Miscellaneous Collect. 290p.

SMITH, L.B.; DOWNS, R.J. Pitcairnoideae (Bromeliaceae). Flora Neotropica Monograph. **The New York Botanical Garden**, v.14, n.1, p.1-678, 1974.

SMITH, L.B.; DOWNS, R.J. Tillandsioideae (Bromeliaceae). Flora Neotropica Monograph. **The New York Botanical Garden**, v.14, n.2, p. 663-1492, 1977.

SMITH, L.B.; DOWNS, R.J. Bromelioideae (Bromeliaceae). Flora Neotropica Monograph. **The New York Botanical Garden**, v.14, n.3, p.1493-2142, 1979.

SMITH, L.B.; TILL, W. Bromeliaceae. In: K. Kubitzki (ed.). The Families and Genera of Vascular Plants IV. **Springer**, p. 74-99, 1998.

SOJKA, J.R.; BRISSON-KIMMICK, S.V.; CARLSON, G.P.; COPPOC, G.L. Dimethyl sulfoxide update – New applications and dosing methods. **Proceedings of the annual convention of the American Association of Equine Practitioners**, v. 36, p.683-690, 1990.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II**. 2. ed. São Paulo: Nova Odessa, 2008. 704p.

STANWOOD, P.C.; ROSS, E.E. Seed storage of several horticultural species in liquid nitrogen (-196°C). **Horticultural Science**, v.14, n.5, p.628-630, 1979.

STEGANI, V.; ALVES, G.A.C.; BERTONCELLI, D.J.; FARIA, R.T. Criopreservação de sementes de rainha do abismo (*Sinningia leucotricha*). **Ornamental Horticulture**, v.23, n.1, p.15-21, 2017.

STUSHNOFF, C.; SEUFFERHELD, M. Cryopreservation of apple (*Malus* species) genetic resources. In: BAJAJ, Y.P.S. Biotechnology in Agriculture and Forestry- **Cryopreservation of Plant Germplasm I**. Springer: New York, p. 87 -101, 1995.

TARDIVO, R. C.; CERVI, A.C. O gênero *Nidularium* Lem. (Bromeliaceae) no estado do Paraná. **Acta Botanica Brasilica**, v.11, p.237-258, 1997.

TARRÉ, E.; PIRES, B.B.M.; GUIMARÃES, A.P.M.; CARNEIRO, L.A.; FORZZA, R.C.; MANSUR, E. Germinability after desiccation, storage and cryopreservation of seeds from endemic *Encholirium* Mart. ex Schult. & Schult. f. and *Dyckia* Schult. & Schult.f. species (Bromeliaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 21, n. 4, p. 777-783, 2007.

TEIXEIRA, A.S.; FALTUS, M.; ZAMECNIK, J.; BENITO, G.M.E.; GARCIA, M.A.D. Glass transition and heat capacity behaviors of plant vitrification solutions. **Thermochemica Acta**, v.593, p.43-49, 2014.

TILL, W. 2000. Tillandsioideae. In: Benzing, D.H. **Bromeliaceae: Profile of an Adaptive Radiation**. Cambridge: Cambridge University Press, 690p.

URAGAMI, A. Cryopreservation by vitrification of cultured cells and somatic embryos from mesophyll tissue of asparagus. **Acta Horticulturae**, v.271, p.109-116, 1990.

URAGAMI, A.; SAKAI, A.; NAGAI, M.; TAKAHASHI, T. Survival of cultured cells and somatic embryos of *Asparagus officinalis* cryopreserved by vitrification. **Plant Cell Reporter**, v.8, p.418-421, 1989.

VAJTA, G. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 60-61, p. 357-364, 2000.

VAJTA, G.; HOLM, P.; KUWAYAMA, M.; BOOTH, P. J.; JACOBSEN, H.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Open Pulled Straw (OPS) vitrification: A new way to reduce cryo injuries of bovine ova and embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v.51, p.53-58, 1998.

VALERI, C. R.; RAGNO, G. Cryopreservation of human blood products. **Transfusion and Apheresis Science**, v. 34, n. 3, p. 271-287, 2005.

VARADARAJAN, G.S.; BROWN, G.K. Morphological variation of some features of subfamily Pticarnioideae (Bromeliaceae) and their significance in pollination biology. **Botanical Gazette**, v. 149, p.82-91, 1988.

VARASSIN, I.G. **Estrutura espacial e temporal de uma comunidade de Bromeliaceae e seus polinizadores em Floresta Atlântica no sudeste do Brasil**. 2002. 96p. (Tese de Doutorado em Ecologia) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas/SP, 2002.

VARASSIN, I. G.; SAZIMA, M. Recursos de Bromeliaceae utilizados por beija-flores e borboletas em Floresta Atlântica no sudeste do Brasil. **Boletim do Museu de Biologia**, v.11/12, p.57-70, 2000.

VENDRAME, W. A.; FARIA, R. T. Phloroglucinol enhances recovery and survival of cryopreserved *Dendrobium nobile* protocorms. **Scientia Horticulturae**, v.128, p.131-135, 2011.

VENDRAME, W. A.; FARIA, R. T.; SORACE, M.; SAHYUN, S. A. Review - Orchid cryopreservation. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 38, n. 3, p. 213-229, 2014.

VIEIRA, M. L. C. Conservação de germoplasma *in vitro*. **Biociência e Desenvolvimento**, n.14, p. 18-20, 2000.

VIEIRA, L. J. **Conservação *in vitro* e criopreservação de espécies de *Manihot***. 2013. 103p. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana/BA.

VOSGUERITCHIAN, S.B.; BUZATO, S. Reprodução sexuada de *Dyckia tuberosa* (Vell.) Beer (Bromeliaceae, Pitcairnioideae) e interação planta-animal. **Revista Brasileira de Botânica**, v.29, p.433-442, 2006.

WALTERS, C.; PAMMENTER, N.W.; BERJAK, P.; CRANE, J. Desiccation damage, accelerated ageing and respiration in desiccation tolerant and sensitive seeds. **Seed Science Research**, v.11, p.135-148, 2001.

WALTERS C.; WHEELER, L.; STANWOOD P.C. Longevity of cryogenically stored seeds. **Cryobiology**, v.48, p.229-244, 2004.

WANDERLEY, M.G.L.; MARTINS, S.E. Bromeliaceae. **Flora Fanerogâmica do estado de São Paulo**. São Paulo: FAPESP, v.5, 2007. 259p.

WITTIMAN, P. The animal community associated with canopy bromeliads of the lowland Peruvian Amazon Rain Forest. **Selbyana**, v.21, n.1, p.48-51, 2000.

WOELDERS, H.; MATTHIJS, A.; ENGEL, B. Effects of trealose, and sucrose, osmolality of the freezing medium, and cooling rate on viability and intractness of sperm after freezing and trawing. **Cryobiology**, v.35, p. 193-195, 1997.

ZANELLA ,C.M.; BRUXEL, M.; PAGG,I G.M.; GOETZE, M.; BUTTOW, M.V.; CIDADE F.W.; BERED, F. Genetic structure and phenotypic variation in wild populations of the medicinal tetraploid species *Bromelia antiacantha* (Bromeliaceae). **American Journal of Botany**, v. 98, p.1511-1519, 2011.

ZANELLA, C.M.; JANKE, A.; PALMA, S.C.; SANTOS, K.E.; PINHEIRO, F.G.; PAGGI, G.M.; SOARES, L.E.S.; GOETZE, M.; BUTTOW, M.V.; BERED, F. Genetics, evolution, and of conservation of Bromeliaceae. **Genetics and Molecular Biology**, v. 35, p.1020-1026, 2012.