

Elisandra Maria Pradella

**CRIOPRESERVAÇÃO DE SEMENTES E CULTURAS
NODULARES DE *Vriesea reitzii* Leme & Costa E *Vriesea
philippocoburgii* Wawra:
CAPACIDADE REGENERATIVA, RESPOSTAS
MORFOANATÔMICAS E BIOQUÍMICAS**

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

Orientador: Prof^a. Dr^a. Rosete Pescador

Coorientador: Prof. Dr. Lírio Luiz Dal Vesco

Florianópolis
2019

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

Pradella, Elisandra Maria
CRIOPRESERVAÇÃO DE SEMENTES E CULTURAS NODULARES
DE *Vriesea reitzii* Leme & Costa E *Vriesea philippocoburgii* Wawra : CAPACIDADE REGENERATIVA,
RESPOSTAS MORFOANATÔMICAS E BIOQUÍMICAS / Elisandra
Maria Pradella ; orientadora, Rosete Pescador,
coorientador, Lírio Luiz Dal Vesco, 2019.
97 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Recursos Genéticos Vegetais. 2. Bromélias endêmicas da Mata Atlântica. 3. Criopreservação de sementes e culturas nodulares . 4. Poliaminas. 5. Ultraestrutura. I. Pescador, Rosete. II. Dal Vesco, Lírio Luiz. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais. IV. Título.

**Criopreservação de sementes e culturas nodulares de
Vriesea reitzii Leme & Costa e *Vriesea philippocoburgi* Wawra: capacidade regenerativa, respostas
morfoanatômicas e bioquímicas**

por

Elisandra Maria Pradella

Dissertação julgada e aprovada em 15/03/2019, em sua forma final, pelo Orientador e membros da Banca Examinadora, para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de Concentração Recursos Genéticos Vegetais, no Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, CCA/UFSC.

Banca Examinadora:



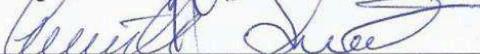
Profª. Drª. Rosete Pescador (Presidente/Orientadora)



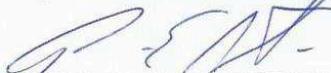
Prof. Dr. Paulo tamaso Mioto (Externo -CCB/UFSC)



Prof. Dr. Miguel Pedro Guerra (Interno - CCA/UFSC)



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



Prof. Dr. Paulo Emílio Lovato (Coordenador do Programa)

Florianópolis, março de 2019

À
TEREZA LORECI PRADELLA E
ARI PRADELLA
Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre guiar e iluminar meus caminhos.

A minha família, em especial a minha mãe Tereza Loreci Pradella, por seu amor incondicional. Ao meu namorado, pelo carinho, atenção, apoio e motivação dados durante este período desafiador.

Ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina, pela oportunidade de desenvolver minha pesquisa e pela formação acadêmica obtida. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento do meu projeto.

Aos meus orientadores, Prof^ª. Dr^ª. Rosete Pescador e Prof. Dr. Lírio Luiz Dal Vesco pela oportunidade em desenvolver minha pesquisa, pela confiança e apoio concedidos e pela amizade estabelecida.

Aos membros da comissão examinadora Prof.^a Dr.^a Cristina Magalhães Ribas dos Santos, Prof. Dr. Paulo Tamasso Miotto, Prof. Dr. Miguel Pedro Guerra, pela contribuição através de sugestões construtivas e enriquecedoras.

Ao Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal (LFDGV) e ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da UFSC, pelo espaço e equipamentos disponibilizados. Aos técnicos de laboratório Franklin Back, Luciano Inacio e Thais Helena Costa Girão Borges pelo auxílio no andamento e realização de análises.

Aos colegas de laboratório Ângelo Heringer, Daniela Goeten, Edison Cardona, Julia Zappellini, Luiza Giacomolli Polesi, Priscila Fernandes de Souza e Sebastian Montoya por compartilharem seus conhecimentos e auxiliarem na realização de análises.

Aos demais colegas e amigos do laboratório Bruna Andriolli, Daniel Rosa, Giuliano Rigo, Mariana Schlickmann, Mariana Schwambach, Nadhine Nostrani Cabral, Paula Sete, Rafaela Rizzolo, Willian Goldoni Costa, pela troca de experiências e momentos felizes. Aos demais amigos Ana Flávia Neri, Anyela Rojas Molina, Lenon Modesto, Valdeir Pereira Lima, pelas boas lembranças deixadas.

As colegas e amigas de casa Ludiana Canton e Daniela Goeten pelas conversas, risadas, pela vivência gratificante.

A todos que contribuíram de alguma forma para tornar meus dias melhores, felizes e produtivos. Levarei sempre comigo as boas lembranças de todos que cruzaram meus caminhos ao longo desta etapa.

When one does a thing, it appears good, otherwise one would not write it. Only later comes reflection, and one discards or accepts the thing. Time is the best censor, and patience a most excellent teacher
(Frédéric Chopin, 1988)

RESUMO

As bromélias desempenham um importante papel ecológico na manutenção dos ecossistemas. O extrativismo ocasionado pelo seu uso ornamental e a progressiva devastação de seu habitat tem aumentando o número de espécies enquadradas em categorias de ameaça. Entre elas, *Vriesea reitzii* Leme & Costa e *Vriesea philippocoburgii* Wawra, ambas epífitas e endêmicas da Mata Atlântica Brasileira. Neste sentido, técnicas de criopreservação representam uma estratégia eficiente para a conservação a longo prazo da diversidade genética destas espécies. Os principais objetivos deste trabalho foram divididos em dois capítulos, sendo: capítulo I: (1) criopreservar cápsulas de *V. reitzii* e *V. philippocoburgii* visando eliminar a contaminação durante o estabelecimento *in vitro*; (2) criopreservar as cápsulas mantendo sua umidade inicial; (3) ilustrar possíveis alterações morfoanatômicas nas sementes decorrentes da criopreservação nestas condições; e (4) comparar as concentrações de poliaminas livres em sementes não criopreservadas e criopreservadas. Capítulo II: (1) desenvolver um protocolo para a criopreservação de culturas nodulares (CNs) de *V. reitzii*; (2) testar o efeito de diferentes tempos de desidratação em solução de vitrificação (PVS2); (3) avaliar a capacidade das CNs em regenerar microbrotos após a criopreservação; e (4) analisar as características histológicas e ultraestruturais das CNs em diferentes etapas do protocolo proposto. Cápsulas maduras de ambas espécies foram coletadas e desinfestadas. Em seguida, foram armazenadas em nitrogênio líquido (+NL) ou em geladeira (-NL). O percentual e o índice de velocidade de germinação foram avaliados durante 21 dias após a inoculação *in vitro* e o percentual de plântulas normais foi avaliado 60 dias após o cultivo *in vitro*. CNs induzidas a partir de sementes foram desidratadas por 0, 15, 30, 60 e 90 min. em PVS2 e submetidas ao NL. O percentual de recuperação das CNs após a criopreservação foi avaliado 35 dias após o cultivo *in vitro*. Aspectos celulares foram analisados em sementes e CNs e as concentrações de poliaminas livres avaliadas nas sementes. Plântulas obtidas a partir da criopreservação das cápsulas não apresentaram contaminação durante o estabelecimento *in vitro*. Sementes criopreservadas com 29% e 12% de umidade apresentaram maior percentual de germinação, bem como maior índice de velocidade de germinação e maior formação de plântulas normais. Além disso, a criopreservação de sementes com 41 e 55% de umidade acarretou em alterações celulares como plasmólise, intensa vacuolização e descompartimentalização celular. Observou-se concentrações mais

elevadas de poliaminas, especialmente putrescina, em sementes criopreservadas. Portanto, essa poliamina pode desempenhar um importante papel na tolerância contra danos decorrentes do congelamento. Na criopreservação de CNs, as maiores taxas de recuperação após o armazenamento em NL foram observados em CNs previamente desidratadas por 15 ou 30 min., 80.0 e 88.7%, respectivamente. CNs desidratadas com PVS2 por 15 min. e cultivadas em meio de cultura suplementado com ANA (2 μ M) e BAP (4 μ M) foram capazes de regenerar microbrotos após a criopreservação, comprovando a viabilidade do protocolo proposto. Através de análises histológicas e ultraestruturais foram verificadas alterações celulares nos dois tratamentos de PVS2 avaliados (15 e 90 min.). No entanto, a exposição das CNs por 15 min. apresentou menor toxicidade, resultando em maiores taxas de recuperação. Este resultado pode estar associado com o maior conteúdo de lipídios e mitocôndrias, bem como grãos de amido e plastoglóbulos nos plastídios, os quais foram observados neste tratamento. A partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que a criopreservação de cápsulas, estando as sementes com umidade inferior a 29% (*V. reitzii*) e com 12% (*V. philippocoburgii*) é uma estratégia para a conservação destas espécies. Da mesma forma, a criopreservação de CNs de *V. reitzii* a partir do protocolo de vitrificação proposto mostrou-se eficiente.

Palavras-chave: Bromeliaceae. Conservação. Criogenia. Poliaminas. Ultraestrutura. Vitrificação.

ABSTRACT

Bromeliads play an important ecological role in maintaining ecosystems. The extractivism caused by its ornamental use and the progressive devastation of its habitat has increased the number of species framed in categories of threat. Among them, *Vriesea reitzii* Leme & Costa and *Vriesea philippocoburgii* Wawra, both epiphytes and endemic to the Brazilian Atlantic Rainforest. In this sense, cryopreservation techniques represent an efficient strategy for the long-term conservation of the genetic diversity of these species. The main objectives of this work were divided into two chapters: Chapter I: (1) cryopreserving capsules of *V. reitzii* and *V. philippocoburgii* to eliminate contamination during in vitro establishment; (2) cryopreserving the capsules while maintaining their initial moisture; (3) to illustrate possible morpho-anatomical changes in the seeds resulting from cryopreservation under these conditions; (4) to compare the concentrations of free polyamines in non-cryopreserved and cryopreserved seeds. Chapter II: (1) to develop a protocol for the cryopreservation of nodular cultures (NCs) of *V. reitzii*; (2) to test the effect of different dehydration times on plant vitrification solution (PVS2); (3) to evaluate the ability of NCs to regenerate microshoots after cryopreservation; (4) to analyze the histological and ultrastructural features of NCs at different stages of the proposed protocol. Mature capsules of the two species were collected and disinfested. They were then stored in liquid nitrogen (+ NL) or in refrigerator (-NL). The germination and the germination speed index were evaluated for 21 days after in vitro inoculation and the percentage of normal seedlings was evaluated 60 days after in vitro culture. NCs induced from seeds were dehydrated for 0, 15, 30, 60 and 90 min. in PVS2 and submitted to NL. The recovery percentage of cryopreserved NCs was evaluated 35 days after in vitro culture. Cellular aspects were analyzed in seeds and NCs and the concentrations of free polyamines evaluated in the seeds. Seedlings obtained from the cryopreservation of the capsules did not present contamination during in vitro establishment. Cryopreserved seeds with 29% and 12% moisture presented higher percentage of germination, as well as higher germination speed index and greater formation of normal seedlings. In addition, cryopreservation of seeds with 41 and 55% moisture resulted in cellular alterations such as plasmolysis, intense vacuolization and cellular decompartmentalization. Higher concentrations of polyamines, especially putrescine, were observed in cryopreserved seeds. Therefore, such polyamine may play an important role in freeze tolerance. In the cryopreservation of NCs, the highest

recovery rates were observed in NCs previously dehydrated for 15 or 30 min., 80.0 and 88.7%, respectively. NCs dehydrated with PVS2 for 15 min. and cultured in culture medium supplemented with 2 μM of ANA and 4 μM of BAP were able to regenerate microshoots after cryopreservation, proving the viability of the proposed protocol. Through histological and ultrastructural analysis, it was possible to verify cellular changes in the two PVS2 treatments evaluated (15 and 90 min). However, the NC exposure for 15 min. presented lower toxicity, resulting in higher recovery rates. This result may be associated with higher content of lipids and mitochondria, as well as starch grains and plastoglobuli in plastids, which were observed in this treatment. From the results obtained, it can be concluded that the cryopreservation of capsules, being the seeds with humidity below 29% (*V. reitzii*) and with 12% (*V. philippocoburgii*) is a strategy for the conservation of these species. In the same way, the proposed vitrification protocol proved to be efficient for the cryopreservation of NCs of *V. reitzii*.

Keywords: Bromeliaceae. Conservation. Cryogenic. Polyamines. Ultrastructure. Vitrification.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1 - Plântulas de *Vriesea reitzii* e *Vriesea philippocoburgii* após 120 e 45 dias de cultivo em meio MS, respectivamente. Plântulas de *Vriesea reitzii* obtidas de: **a** Sementes não criopreservadas e **b** Criopreservadas. Plântulas de *Vriesea philippocoburgii* obtidas de: **c** Sementes não criopreservadas e **d** Criopreservadas. *tg* tegumento; *fl* folhas; *ap* apêndices plumosos; **a, b** barras = 3 mm; **c, d** barras = 2 mm 50

Figura 2 - Análise histológica de secções transversais de embriões zigóticos de *Vriesea reitzii* e *Vriesea philippocoburgii*. **a, b** Células embrionárias de sementes oriundas de cápsulas de *Vriesea reitzii* não criopreservadas contendo 29 e 41-55% de umidade, respectivamente. **c** Células embrionárias de sementes contendo 12% de umidade oriundas de cápsulas de *Vriesea philippocoburgii* não criopreservadas **d, e** Células embrionárias de sementes contendo 29 e 41-55% de umidade, respectivamente, oriundas de cápsulas criopreservadas de *Vriesea reitzii*. **f** Células embrionárias de sementes contendo 12% de umidade oriundas de cápsulas de *Vriesea philippocoburgii* criopreservadas. *PC* parede celular; *P* plasmólise; *V* vacuolização; *ponta de seta preta* núcleo; *seta preta* procâmbio; **barras a, b, c, d, e, f** = 20 μm 52

CAPÍTULO II

Figura 1 - Fluxograma do protocolo de vitrificação para culturas nodulares de *Vriesea reitzii*. 75

Figura 2 - CNs, 35 dias após o reaquecimento e microbrotos de *Vriesea reitzii* *in vitro*. **a** CNs não submetidos a PVS2; **b, c, d, e** CNs submetidas a PVS2 por 15, 30, 60 e 90 min., respectivamente; **f** CNs não submetidas a PVS2, mas submetidas ao nitrogênio líquido; **g, h, i, j** CNs submetidas a PVS2 por 15, 30, 60 e 90 min., respectivamente e submetidas ao nitrogênio líquido; **k** Microbrotos regenerados a partir de CNs desidratadas em PVS2 por 15 min. e criopreservadas em nitrogênio líquido 60 dias após o cultivo em MS gelificado e suplementado com ANA (2 μM) e BAP (4 μM); **barras a-k** = 1 mm 80

Figura 3 - Microscopia óptica e microscopia eletrônica de transmissão de CNs de *Vriesea reitzii* não criopreservadas, após a desidratação em PVS2 e logo após o armazenamento em NL. CNs não submetidas à PVS2 ou ao NL. **a** CNs cultivadas em meio MS gelificado suplementado com ANA (4 μM) (controle); **b** Células apresentando alta razão núcleo/citoplasma; **c** Célula com núcleo preservado e nucléolo

evidente; **d** Células apresentando plastídios contendo grãos de amido e plastoglóbulos. CNs desidratadas em PVS2 durante 15 min. **e** Células com citoplasma denso; **f** Célula plasmolisada contendo muitos corpos lipídicos e núcleo com maior proporção de heterocromatina; **g** Plastídios contendo grãos de amido e muitos plastoglóbulos. CNs desidratadas em PVS2 durante 90 min. **h** Células preservadas; **i** Células plasmolisadas com maior vacuolização; **j** Células com grande conteúdo lipídico, fusão vacuolar e menor relação núcleo/citoplasma; **k** Células apresentando plastídios com muitos plastoglóbulos. CNs criopreservadas após desidratação em PVS2 por 15 min. **l** Células plasmolisadas na região central e células preservadas nas regiões periféricas; **m** Células não plasmolisadas, contendo muitos lipídios e plastídios ricos em plastoblóbulos; **n** Células plasmolisadas; **o** Núcleo com regiões de heterocromatina e plastídios contendo grãos de amido. CNs criopreservadas após desidratação em PVS2 por 90 min. **p** Células preservadas (região superior) e células plasmolisadas (região inferior); **q** Células apresentando menor conteúdo lipídico; **r** Núcleo apresentando elevada proporção de heterocromatina; **s** Células intensamente plasmolisadas e vacuolizadas; *N* núcleo; *PC* parede celular; *V* vacúolo; *M* mitocôndria; *P* plastídio; *MP* membrana plasmática; *RE* retículo endoplasmático; *Nu* nucléolo; *EN* envelope nuclear; *A* grãos de amido; *L* lipídios; *He* heterocromatina; *VA* vesículas autofágicas; *ponta de seta preta* plasmólise; *barra a* = 1 mm; *barra b, e, h, i, l, p* = 20 µm; *barra c, d, g, o, r* = 1 µm; *barra f, j, k, m, n, q, s* = 2 µm 83

Figura 4 - Microscopia óptica e microscopia eletrônica de transmissão de CNs de *Vriesea reitzii* após o descongelamento e após a recuperação in vitro. CNs desidratadas por 15 min. em PVS2, criopreservadas e descongeladas em banho-maria. **a** Células preservadas; **b** Células com plasmólise; **c** Vacuolização intensa e possível ocorrência de vesículas autofágicas; **d** Núcleo apresentando modificações estruturais e alta proporção de heterocromatina. CNs desidratadas por 90 min. em PVS2, criopreservadas e descongeladas em banho-maria. **e** Células preservadas; **f** Células plasmolisadas e intensamente vacuolizadas; **g** Célula apresentando rompimento da membrana plasmática; **h** Células apresentando desintegração da parede celular e plastídios sem plastoglóbulos e grãos de amido. CNs desidratadas por 15 min. em PVS2, criopreservadas, descongeladas em banho-maria, coletadas 10 dias após a recuperação na luz. **i** Aspecto morfológico das CNs; **j** Células regeneradas (região periférica); **k** Células regeneradas com presença de compostos polifenólicos e plastídios contendo grãos de amido e plastoglóbulos; **l** Células apresentando núcleo com poucas regiões de

heterocromatina. CNs desidratadas por 90 min. em PVS2, criopreservadas, descongeladas em banho-maria, coletadas 10 dias após a recuperação na luz. **m** Aspecto morfológico das CNs; **n** Células plasmolisadas; **o** Células altamente degradadas apresentando parede celular desintegrada; **p** Células apresentando núcleo degenerado e estruturas não identificadas. CNs desidratadas por 15 min. em PVS2, criopreservadas, descongeladas em banho-maria e coletadas 35 dias após a recuperação na luz. **q** Aspecto morfológico das CNs; **r** Células com citoplasma denso e alta razão núcleo/citoplasma; **s** Células com menor conteúdo de compostos polifenólicos e núcleo contendo baixa proporção de heterocromatina; **t** Células apresentando muitos plastídios contendo grãos de amido. CNs desidratadas por 90 min. em PVS2, criopreservadas, descongeladas em banho-maria e coletadas 35 dias após a recuperação na luz. **u** Aspecto morfológico das CNs; **v** Células altamente degradadas; **w** Células apresentando parede celular desintegrada e membrana plasmática rompida; **x** Célula em estágio avançado de morte celular; *N* núcleo; *PC* parede celular; *V* vacúolo; *M* mitocôndria; *P* plastídeo; *MP* membrana plasmática; *RE* retículo endoplasmático; *Nu* nucléolo; *EN* envelope nuclear; *A* grãos de amido; *L* lipídios; *He* heterocromatina; *VA* vesículas autofágicas; *C* compostos polifenólicos; *ponta de seta preta* plasmólise; *NI* não identificado; *barra q, u* = 1 mm; *barra a, b, e, f, j, n, r, v* = 20 μm ; *barra i, m* = 500 μm *barra d, l, p* = 1 μm ; *barra c, g, h, k, o, s, t, w, x* = 2 μm 86

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1 - Taxa de germinação, índice de velocidade de germinação (IVG) e percentual de plântulas normais de *Vriesea reitzii* (*V. r*) e *Vriesea philippocoburgii* (*V. p*) em função do armazenamento e do teor de umidade das sementes. Sementes não criopreservadas (-NL) e sementes criopreservadas (+NL)..... 49

Tabela 2 - Poliaminas livres em *Vriesea reitzii* em função do tipo de armazenamento. Sementes não criopreservadas (-NL) e sementes criopreservadas (+NL)..... 53

Tabela 3 - Poliaminas livres em *Vriesea reitzii* em função do teor de umidade 53

Tabela 4 - Poliaminas livres em sementes de *Vriesea philippocoburgii* em função do armazenamento. Sementes não criopreservadas (-NL) e sementes criopreservadas (+NL)..... 54

CAPÍTULO II

Tabela 1 - Percentual de recuperação de culturas nodulares de *Vriesea reitzii* cultivadas *in vitro* por 35 dias após as seguintes condições: CNs tratadas com todas as soluções, exceto PVS2 no tempo 0, mas não armazenadas em nitrogênio líquido (-NL); CNs tratadas com todas as soluções, exceto PVS2 no tempo 0 e armazenadas em nitrogênio líquido (+NL) 79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANA	Ácido naftaleno acético
ANOVA	Análise de variância
BAP	Benzilaminopurina
CNs	Culturas nodulares
DAH	1,7-diaminoheptano
DMSO	Dimetilsulfóxido
EROs	Espécies reativas de oxigênio
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
IVG	Índice de velocidade de germinação
MCP	Morte celular programada
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MF	Massa fresca
MO	Microscopia óptica
MS	MURASHIGE & SKOOG
NL	Nitrogênio líquido
PAs	Poliaminas
PGs	Platoglóbulos
PQ-9	Plastoquinona-9
Put	Putrecina
PVS	Solução de vitrificação
Spd	Espermidina
Spm	Espermina
TULC	Teor de umidade limite para a criopreservação

SUMÁRIO

1 ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVA	25
REFERÊNCIAS	31
2 CAPÍTULO I: CRIOPRESERVAÇÃO DE CÁPSULAS DE <i>Vriesea reitzii</i> Leme & Costa E <i>Vriesea phillippocoburgii</i> Wawra: ASPECTOS MORFOFISIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS	41
2.1 INTRODUÇÃO	43
2.2 MATERIAL E MÉTODOS	45
2.2.1 Material vegetal	45
2.2.2 Criopreservação	45
2.2.3 Germinação e velocidade de germinação	46
2.2.4 Microscopia óptica e histologia	46
2.2.5 Poliaminas livres.....	46
2.2.6 Delineamento experimental e análise estatística.....	47
2.3 RESULTADOS.....	47
2.3.1 Aspectos morfofisiológicos.....	47
2.3.2 Aspectos anatômicos e bioquímicos	50
2.4 DISCUSSÃO.....	54
2.4.1 Qualidade fisiológica das sementes	54
2.4.2 Aspectos anatômicos	55
2.4.3 Poliaminas livres.....	57
2.5 CONCLUSÃO	58
REFERÊNCIAS	59
3 CAPÍTULO II. CRIOPRESERVAÇÃO DE CULTURAS NODULARES DE <i>Vriesea reitzii</i> POR VITRIFICAÇÃO: CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS E ULTRAESTRUTURAIS	69
3.1 INTRODUÇÃO	71
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	72
3.2.1 Indução de CNs.....	72
3.2.2 Criopreservação	73
3.2.3 Regeneração de microbrotos após a criopreservação	74

3.2.4 Análises anatômicas	76
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	77
3.3.1 Criopreservação e regeneração de microbrotos.....	77
3.3.2 Respostas morfohistológicas e ultraestruturais de CNs em diferentes etapas da criopreservação	80
3.4 CONCLUSÃO	88
REFERÊNCIAS	89
4 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	97

1 ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVA

O bioma Mata Atlântica é um *Hotspot* mundial de biodiversidade (MYERS et al., 2000). A família Bromeliaceae representa um importante componente deste bioma. Suas espécies formam um micro-habitat e estabelecem interações com diversas outras espécies, contribuindo significativamente com a biodiversidade e estabilidade do ecossistema onde estão inseridas (BENZING, 2000; MARTINELLI, 2000; DÉZERARD et al., 2018). Entretanto, o número de espécies ameaçadas desta família tem aumentado devido a progressiva devastação de seus habitats (REITZ, 1983; MARTINELLI et al., 2008; GIVNISH et al., 2011).

A família Bromeliaceae está dividida em oito subfamílias: Bromelioideae; Tillandsioideae; Navioideae; Brocchinioideae; Lindmanioideae; Pitcairnioideae; Hechtioideae; Puyoideae. Compreende 3584 espécies, as quais distribuem-se em 75 gêneros (GOUDA et al. [cont. Atualizado]). Com exceção da espécie *Pitcairnia feliciana* (A. Chev.) Harms & Mildbr., que ocorre na costa oeste da África, as demais espécies ocorrem no continente americano, distribuindo-se desde o sul da América do Norte até a Patagônia (SMITH e DOWNS, 1974). Mais de 50% das espécies são epífitas e cerca de 40% das bromélias registradas na Mata Atlântica se enquadram em alguma categoria de ameaça (MATTINELLI et al., 2008). Tillandsioideae Harms é a maior das oito subfamílias (40% das espécies), ocorrendo desde os Estados Unidos até o sul da Argentina e do Chile (BARFUSS et al., 2016; GOUDA et al. [cont. Atualizado]). *Vriesea* Lindley é o segundo gênero mais diverso de Tillandsioideae, compreendendo 226 espécies (GOUDA et al. [Cont. Atualizado]) e o quinto gênero mais diverso dentre as angiospermas da Mata Atlântica brasileira (STEHMANN et al., 2009). O bioma Mata Atlântica é o principal centro de diversidade do gênero *Vriesea* (COSTA et al., 2014).

Vriesea reitzii Leme e Costa é uma bromélia epífita e endêmica, ocorrendo no sul do Brasil em altitudes entre 750 e 1.200 m, nos domínios da Floresta Ombrófila Mista (LEME e COSTA, 1991). A espécie é altamente vulnerável, pois *Araucaria angustifolia*, seu habitat epífita primário, teve suas populações naturais extremamente reduzidas (KLEIN, 1990; LEME e COSTA, 1991). De acordo com o Centro Nacional de Conservação da Flora (CNCFlora), *V. reitzii* encontra-se na categoria de “Quase ameaçada” (NT) de extinção. Está presente também na lista de espécies da flora ameaçada de extinção do Rio Grande do Sul na categoria “Vulnerável” (VU) (CONSEMA-RS, 2002). *Vriesea philippocoburgii*

Wawra, por sua vez, é uma espécie epífita e endêmica do Brasil, presente nos estados do RJ, SP, PR, SC e RS (FORZZA et al., 2015). Encontra-se na categoria de “Menos preocupante” (LC), pelo CNCFlora e está presente na lista de espécies da flora ameaçada de extinção do Rio Grande do Sul na categoria "Em perigo" (EN) (CONSEMA-RS, 2002).

No cultivo *in vitro* de bromélias observa-se um padrão de resposta morfogênico distinto dos sistemas regenerativos tradicionais baseados em organogênese e embriogênese somática. Este padrão é definido como culturas nodulares (CNs) (GEORGE, 1993). CNs consistem em aglomerados de nódulos organogênicos com coloração verde-amarelada a translúcida e textura friável ou levemente compacta. Protocolos para indução de CNs em *V. reitzii* já foram estabelecidos e este modelo regenerativo representa uma estratégia eficiente para a micropropagação da espécie em larga escala (GUERRA e DAL VESCO, 2010; SCHERER et al., 2013; DAL VESCO et al., 2014a, b). As CNs apresentam elevada capacidade regenerativa, culminando na produção de brotos adventícios. Esta característica faz com que as CNs sejam fortes candidatas para atuarem em processos de criopreservação.

Diferentes estratégias são utilizadas para a indução de CNs em bromeliáceas. Sua origem é reportada a partir da base foliar (ALVES et al., 2006; RECH FILHO et al., 2009; GUERRA E DAL VESCO 2010; SCHERER et al., 2013; DAL VESCO et al., 2014a; CORREDOR-PRADO et al., 2015), de sementes (DAL VESCO et al. 2014b) e segmentos nodais (DAL VESCO et al. 2011). Estudos sobre as características histoquímicas durante a indução de CNs a partir de base foliar e sementes em *V. reitzii*, indicam que a formação dessas estruturas parece estar relacionada com os meristemas radicular e caulinar do embrião quando originadas a partir de sementes (DAL VESCO et al., 2014b; CORREDOR-PRADO et al., 2015), e relacionada com os meristemas intercalar e marginal quando originadas a partir dos explantes foliares (HOSOKI E ASAHIRA, 1980; CORREDOR-PRADO et al., 2015).

A criopreservação é uma técnica promissora para a conservação de recursos genéticos vegetais, incluindo espécies raras ou ameaçadas de extinção (ENGELMANN, 2011; WYSE et al., 2018). Consiste no armazenamento de materiais biológicos em temperaturas ultrabaixas (-196°C), as quais interrompem a divisão celular e a maioria dos processos metabólicos e físicos, garantindo a conservação por longo prazo (GONZÁLEZ-ARNAO e ENGELMANN, 2013). Além disso, apresenta vantagens em relação a outros métodos como menor necessidade por espaço e mão-de-obra, bem como menor risco de variações somaclonais

e instabilidade genética (VILLALOBOS e ENGELMANN, 1995; ENGELMANN e DRUSSERT, 2013).

Atualmente existem diversas técnicas de criopreservação (FUNNEKOTTER et al., 2017), as quais se baseiam no princípio da vitrificação. Definida como a transição da água diretamente da fase líquida para uma fase amorfa ou vítrea, evitando a formação de cristais de gelo intracelulares (FAHY et al. 1984). Para atingir este estado, são utilizadas soluções crioprotetoras concentradas, as quais proporcionam aumento da viscosidade celular, desidratação celular adequada e supressão da formação de gelo (VOLK e WALTERS, 2006). Dessa forma, evita-se a ruptura do sistema de membranas celulares e a perda de permeabilidade e compartimentalização das células, geralmente decorrentes do congelamento/descongelamento (SAKAI et al., 1990). Esta etapa, conhecida por desidratação, é crucial para garantir a sobrevivência e a integridade genética e fisiológica após a criopreservação (GONZÁLEZ-ARNAO e ENGELMANN, 2013).

As soluções de vitrificação PVS (*Plant Vitrification Solution*) foram desenvolvidas pelo grupo Sakai, sendo as mais conhecidas e utilizadas para desidratar materiais antes da criopreservação (VOLK e WALTERS, 2006; STEGANI et al., 2017). Os componentes destas soluções podem ser permeáveis ou não à membrana celular (PANIS e LAMBARDI, 2006). Dentre os componentes mais comuns estão: glicerol, dimetilsulfóxido (DMSO), etilenoglicol, propilenoglicol e metanol, bem como uma grande variedade de açúcares, particularmente sacarose, trealose e rafinose (SAKAI et al., 1990; SAKAI e ENGELMANN, 2007; BENSON 2008). Estes agentes podem ser tóxicos para determinadas espécies, como é o caso do DMSO. Sendo assim, torna-se fundamental definir o tipo de solução utilizada na desidratação, bem como o tempo de contato dos materiais com a solução predefinida (SAKAI et al., 2008).

Na família Bromeliaceae, o uso de técnicas de criopreservação tem sido relatado em espécies selvagens e domesticadas do gênero *Ananas* spp., sendo criopreservados ápices, calos organogênicos e pólen (GONZALEZ ARNAO et al., 1998; MARTÍNEZ-MONTERO et al., 2012; SOUZA et al., 2016; SOUZA et al., 2018b). Outros trabalhos descrevem a criopreservação de grãos de pólen de espécies dos gêneros *Aechmea* spp., *Guzmania* spp., *Tillandsia* spp. e *Vriesea* spp. (PARTON et al., 2002; SOUZA et al., 2018a), além do êxito na criopreservação de sementes de espécies dos gêneros *Alcantarea* spp., *Dyckia* spp., *Encholirium* spp., *Nidularium* spp., *Pitcairnia* spp., *Vriesea* spp., *Wittrockia* spp. (TARRÉ et al., 2007; PEREIRA et al., 2010;

HMELJEVSKI et al., 2014; RODRIGUES et al., 2014; FERRARI et al., 2016). Os estudos com sementes sugerem um comportamento ortodoxo das espécies avaliadas, uma vez que sobreviveram à dessecação e ao congelamento.

Análises de microscopia são grandes aliadas da criobiologia, pois durante as diferentes etapas da criopreservação, podem ocorrer danos estruturais/mecânicos nas células, os quais podem ser verificados com auxílio destas análises. Dentre os danos já relatados estão a plasmólise (ZHANG et al., 2014; VOLK e CASPERSEN et al., 2017), o aumento da vacuolização celular, podendo ser seguido por autofagia e morte celular programada (MCP) (WESLEY-SMITH et al., 2015), o aumento na proporção de heterocromatina em relação a eucromatina (WEN et al., 2012; HERINGER et al., 2013) e maior conteúdo de mitocôndrias (SERSHEN et al., 2012; ZHANG et al., 2014).

Além de alterações celulares, compostos bioquímicos, tais como as poliaminas (PAs), também podem ser afetados durante ou após os tratamentos criogênicos. PAs são bases nitrogenadas alifáticas de baixo peso molecular contendo dois ou mais grupos amino, as quais possuem atividade biológica potente (XU et al., 2009; VUOSKU et al., 2018; CHEN et al., 2019). Putrescina (Put), espermidina (Spd) e espermina (Spm) são as principais PAs encontradas em plantas, as quais estão envolvidas na regulação de diversos processos fisiológicos e do desenvolvimento (SHI e CHAN, 2014; XU et al., 2014; MUSTAFAVI et al., 2018; CHEN et al., 2019) e na MCP (MOSCHOU e ROUBELAKIS-ANGELAKIS, 2014). Além disso, diversos estudos têm apresentado que as PAs são capazes de aumentar a tolerância a estresses abióticos, pois elas estabilizam a composição molecular das membranas e suprimem a peroxidação lipídica (HUSSAIN et al. 2011; MINOCHA et al., 2014).

Apesar do grande número de estudos sobre as PAs, há poucos relatos sobre o seu papel na sobrevivência de plantas após a criopreservação. Ramon et al. (2002), apresentam correlação entre o incremento de Put e na taxa de sobrevivência após a criopreservação de meristemas de bananeira. Forni et al. (2010), avaliaram a concentração de PAs durante a criopreservação de ápices caulinares de macieira e Vondráková et al. (2010), associaram a presença destes compostos com a criotolerância de culturas embriogênicas de *Picea abies*. Neste sentido, as PAs são fortes candidatas para atuarem na criotolerância de bromélias.

As informações existentes sobre o processo de criopreservação e armazenamento *ex situ* de bromélias endêmicas da Mata Atlântica ainda são insuficientes. Entretanto, este conhecimento é essencial para o desenvolvimento de programas efetivos para a conservação da flora

nativa (RODRIGUES et al., 2014). Além disso, o emprego da criopreservação na conservação de sementes ortodoxas também é uma tendência, tendo em vista a baixa longevidade apresentada por algumas espécies nos bancos convencionais de sementes (LI e PRITCHARD, 2009).

REFERÊNCIAS

- ALVES, G. M., RECH FILHO, A., PUCHALSKI, A., REIS, M. S., NODARI, R. O., GUERRA, M. P. Allozymic markers and genetic characterization of a natural population of *Vriesea friburgensis* var. *paludosa*, a bromeliad from the Atlantic Forest. **Plant Genetic Resources**, v.2, n.1, p.23-28, 2004.
- BARFUSS, M.H.J.; TILL, W.; LEME, E.M.C.; PINZÓN, J.P.; MANZANARES, J.M.; HALBRITTER, H.; SAMUEL, R.; BROWN, G.K. Taxonomic revision of Bromeliaceae subfam. Tillandsioideae based on a multi-locus DNA sequence phylogeny and morphology. **Phytotaxa**, v. 279, n. 1, 2016.
- BENSON, E.E. Cryopreservation theory. In: REED, B.M. (ed) **Plant cryopreservation: a practical guide**. Springer, New York, p. 15–32, 2008.
- BENZING, D. H. **Bromeliaceae: Profile of an Adaptive Radiation**. Cambridge University Press, New York. 2000.
- CHEN, D.; SHAO, Q.; YIN, L.; YOUNIS, A.; ZHENG, B. Polyamine Function in Plants: Metabolism, Regulation on Development, and Roles in Abiotic Stress Responses. **Frontiers in plant science**, v. 9, p. 1945, 2019.
- CNCFlora. *Vriesea philippocoburgii* in Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012.2 Centro Nacional de Conservação da Flora. Disponível em <[http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Vriesea philippocoburgii](http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Vriesea%20philippocoburgii)>. Acesso em 27 fevereiro 2019.
- CNCFlora. *Vriesea reitzii* in Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012.2 Centro Nacional de Conservação da Flora. Disponível em <[http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Vriesea reitzii](http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Vriesea%20reitzii)>. Acesso em 27 fevereiro 2019.
- CONSELHO ESTADUAL DO MEIO AMBIENTE, RIO GRANDE DO SUL. Decreto estadual CONSEMA 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, Palácio Piratini, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 31 dez. 2002.

CORREDOR-PRADO, J. P.; SCHMIDT, E. C.; GUERRA, M. P.; BOUZON, Z. L.; DAL VESCO, L. L.; PESCADOR, R. Histodifferentiation and ultrastructure of nodular cultures from seeds of *Vriesea friburgensis* Mez var. *paludosa* (L.B. Smith) L.B. Smith and leaf explants of *Vriesea reitzii* Leme and A. Costa (Bromeliaceae). **Journal of Microscopy and Ultrastructure**, v. 3, n. 4, p. 200-209, 2015.

COSTA, A.F.; GOMES-DA-SILVA, J.; WANDERLEY, M.G.L. *Vriesea* (Bromeliaceae, Tillandsioideae): taxonomic history, and morphology of the Brazilian lineage. **Journal of the Torrey Botanical Society**, v. 141, n. 4, p. 338-352, 2014.

DAL VESCO, L. L.; STEFENON, V. M.; WELTER, L. J.; SCHERER, R. F.; GUERRA, M. P. Induction and scale-up of *Bilbergia zebrina* nodule cluster cultures: implications for mass propagation, improvement and conservation. **Scientia Horticulturae**, v. 128, n. 4, p. 515-522, 2011.

DAL VESCO, L. L.; VIEIRA, P. M.; CORREDOR-PRADO, J. P.; PESCADOR, R.; ELTER, L. J.; GUERRA, M. P. Induction and development of nodular cluster cultures in *Vriesea reitzii* (Leme and Costa), an endangered bromeliad from the Brazilian Atlantic Forest. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 89, n. 5, p. 542-548, 2014a.

DAL VESCO, L. L.; PESCADOR, R.; CORREDOR PRADO, J. P.; ELTER, L. J.; GUERRA, M.P. In vitro propagation of *Vriesea reitzii*, a native epiphyte bromeliad from the Atlantic rainforest. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 36, n. 3, p. 271-8, 2014b.

DÉZÉRALD, O.; LEROY, C.; CORBARA, B.; DEJEAN, A.; TALAGA, S.; CÉRÉGHINO, R. Tank bromeliads sustain high secondary production in neotropical forests. **Aquatic Sciences**, v. 80, n. 14, Jan. 2018.

ENGELMANN, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 47, n. 1, p. 5-16, 2011.

ENGELMANN, F.; DUSSERT, S. Cryopreservation. In: NORMAH, M.; CHIN, H.; REED, B. (eds). **Conservation of Tropical Plant Species**. Springer, New York, NY, 2013.

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.; DE FARIA, R.T.; TAKANE, R.J. Cryopreservation of seeds of *Encholirium spectabile* Martius ex Schultes f. by the vitrification method. **Revista Ciência Agronômica**, v. 47, n. 1, p. 172–177, 2016.

FORNI, C.; BRAGLIA, R.; BENINATI, S.; LENTINI, A.; RONCI, M.; URBANI, A.; PROVENZANO, B.; FRATTARELLI, A.; TABOLACCI, C.; DAMIANO, C. Polyamine concentration, transglutaminase activity and changes in protein synthesis during cryopreservation of shoot tips of apple variety Annurca. **Cryo Letters**, v. 31, n. 5, p. 413-425, 2010.

FORZZA, R.C.; COSTA, A.; SIQUEIRA FILHO, J.A.; MARTINELLI, G.; MONTEIRO, R.F.; SANTOS-SILVA, F.; SARAIVA, D. P.; PAIXÃO-SOUZA, B.; LOUZADA, R.B.; VERSIEUX, L. **Bromeliaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB6526>>. Acesso em: 1 março 2019.

FUNNEKOTTER, B.; MANCERA, R.L.; BUNN, E. Advances in understanding the fundamental aspects required for successful cryopreservation of Australian flora. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 53, n. 4, p. 289-298, 2017.

GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture: the technology**. Part 1, 2 ed. Exegetics: Edington, 1993. 574 p.

GIVNISH, T. J.; BARFUSS, M. H.; VANE, B.; RIINA, R.; SCHULTE, K.; HORRES, R.; GONSISKA, P. A.; JABAILY, R. S.; CRAYN, D. M.; SMITH, J. 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. 872-895, 2011.

GONZÁLEZ-ARNAO M.T.; RAVELO M.M.; URRÁ C.; MARTÍNEZ-MONTERO M.E.; ENGELMANN F. Cryopreservation of pineapple (*Ananas comosus*) apices. **Cryo Letters**, v. 19, p. 375-382, 1998.

GONZÁLEZ-ARNAO, M. T.; ENGELMANN, F. **Crioconservación de plantas en América Latina y el Caribe**. San José: IICA, 2013, 204 p.
 GOUDA, E.J., BUTCHER, D. & GOUDA, K. (2018) [continuously updated] Encyclopaedia of Bromeliads. Version 3.2. Available from: <http://encyclopedia.florapix.nl/> (accessed January 2018).

GUERRA, M. P.; DAL VESCO, L. L. Strategies for the Micropropagation of Bromeliads. In: JAIN, S. M.; OCHATT, S.J. (eds.) **Protocols for in vitro propagation of ornamental plants: Methods in Molecular Biology**. New York: Humana Press-Springer, v. 589, p. 47-66, 2010.

HMELJEVSKI, K.V.; FREITAS, L.; DOMINGUES, R.; PEREIRA, A.R., CANCIO, A.S.; ANDRADE, A.C.; MACHADO, M.A.; VICCINIC, L.F.; FORZZA, R.C. Conservation assessment of an extremely restricted bromeliad highlights the need for population-based conservation on granitic inselbergs of the Brazilian Atlantic Forest. **Flora – Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, v. 209, n. 5, p. 250-259, 2014.

HOSOKI, T.; ASAHIRA, T. In vitro propagation of bromeliads in liquid culture. **HortScience**, v. 15, n. 5, p. 603-4, 1980.

HUSSAIN, S.S.; ALI, M.; AHMAD, M.; SIDDIQUE, K.H.M. Polyamines: natural and engineered abiotic and biotic stress tolerance in plants. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 3, p. 300–311, 2011.

KLEIN, R.M. **Espécies raras ou ameaçadas de extinção do estado de Santa Catarina**. Rio de Janeiro:IBGE - Diretoria de Geociências, 1990.
 LEME, E.M.C.; COSTA, A. A new species from Southern Brazil, a tribute to Father Raulino Reitz. **Journal of the Bromeliad Society**. 41:195-198, 1991.

LI, D.Z.; PRITCHARD, H.W. The science and economics of ex situ plant conservation. **Trends in Plant Science**, v. 14, n. 11, p. 614-621, 2009.

MARTINELLI, G. The Bromeliads of the Atlantic Forest. **Scientific American**, v. 282, n. 3, p. 86-93, 2000.

MARTINELLI, G.; VIEIRA, C. M.; GONZALEZ, M.; LEITMAN, P.; PIRATININGA, A.; FERREIRA DA COSTA, A.; FORZZA, R.C. Bromeliaceae da mata atlântica brasileira: lista de espécies, distribuição e conservação. **Rodriguésia**, v.59, n.1, p.209-258, 2008.

MARTINEZ-MONTERO, M.E.; GONZALEZ-ARNAO, M.T.; ENGELMANN, F. Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm with Vegetative Propagation—Review of Sugarcane (*Saccharum* spp.) and Pineapple (*Ananas comusus* (L.) Merrill) Cases. In: KATKOV, I. (ed.). **Current Frontiers in Cryopreservation**. Intech, 2012, p. 359-396.

MINOCHA, R.; MAJUMDAR, R.; MINOCHA, S.C. Polyamines and abiotic stress in plants: a complex relationship. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, n. 175, 2014.

MOSCHOU, P.N.; ROUBELAKIS-ANGELAKIS, K.A. Polyamines and programmed cell death. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, p. 1285–1296, 2014.

MUSTAFAVI, S.H.; BADI, H.N.; SEKARA, A.; AL, E. Polyamines and their possible mechanisms involved in plant physiological processes and elicitation of secondary metabolites. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 40, n. 102, 2018.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; FONSECA, G. A. B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p. 853-858, 2000.

PANIS, B.; LAMBARDI, M. Status of cryopreservation technologies in plants (crops and forest trees). In: RUANE, J.; SONNINO, A. (eds). **The role of biotechnology in exploring and protecting agricultural genetic resources**. United Nations Food and Agriculture Organization (FAO), Rome, 2006, p. 61–78.

PARTON, E.; VERVAEKE, I.; DELEN, R.; VANDENBUSSCHE, B.; DEROOSE, R. E; DE PROFT, M. Viability and storage of bromeliad pollen. **Euphytica**, v. 125, n. 2, p. 155-161, 2002.

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 & Technology**, v. 38, n.1, p. 79-87, 2010.

RAMON, M.; GEUNS, J.M.C.; SWENNEN, R.; PANIS, B. Polyamines and fatty acids in sucrose precultured banana meristems and correlation with survival rate after cryopreservation. **Cryo Letters**, v. 23, n. 6, p. 345–352, 2002.

REITZ, R. **Bromeliáceas e a Malária-Bromélia Endêmica**. Flora Ilustrada Catarinense. Itajaí: Herbário Bardosa Rodrigues. 1983, 518 p.

RODRIGUES, A.R.P.; FORZZA, R.C.; ANDRADE, A.C.S. 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, n. 4, p. 567-578, 2014.

SAKAI, A.; ENGELMANN, F. Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: a review. **Cryo Letters**, v. 28, n. 3, p. 151–172, 2007.

SAKAI, A.; HIRAI, D.; NIINO, T. Development of PVS-based vitrification and encapsulation-vitrification protocols. In: REED, B.M. (ed.). **Plant Cryopreservation: A practical Guide**, Springer, New York, p. 33–58, 2008.

SAKAI, A.; KOBAYASHI, S.; OIYAMA, I. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. **Plant Cell Reports**, v. 9, n. 1, p. 30–33, 1990.

SCHERER, R. F.; GARCIA, A. C.; FRAGA, H. P. F.; DAL VESCO, L. L.; STEINMACHER, D.; GUERRA, M. P. Nodule cluster cultures and temporary immersion bioreactors as a high performance micropropagation strategy in pineapple (*Ananas cosmosus* var. *cosmosus*). **Scientia Horticulturae**, v. 151, p. 38-45, 2013.

SERSHEN; BERJAK, P.; PAMMENTER, N.W.; WESLEY-SMITH, J. The effects of various parameters during processing for cryopreservation

on the ultrastructure and viability of recalcitrant zygotic embryos of *Amaryllis belladonna*. **Protoplasma**, v. 249, n. 1, p. 155–169, 2012a.

SHI, H.; CHAN, Z. Improvement of plant abiotic stress tolerance through modulation of the polyamine pathway. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 56, n. 2, p. 114-121, 2014.

SMITH, L. B.; DOWNS, R. J. **Pitcairnioideae (Bromeliaceae)**. Flora Neotropica Monograph, 1974, 658 p.

SOUZA, F. V. D.; KAYA, E.; DE, L.; SOUZA, E. H.; AMORIM, V. B. DE. O.; SKOGERBOE, D.; MATSUMOTO, T.; ALVES, A.; LEDO, C. A. DA. S.; JENDEREK, M. Droplet-vitrification and morphohistological studies of cryopreserved shoot tips of cultivated and wild pineapple genotypes. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 124, n. 2, p. 351-360, 2016.

SOUZA, F. V. D.; KAYA, E.; DE, L.; SOUZA, E. H.; AMORIM, V. B. DE. O.; SKOGERBOE, D.; MATSUMOTO, T.; ALVES, A.; LEDO, C. A. DA. S.; JENDEREK, M. Droplet-vitrification and morphohistological studies of cryopreserved shoot tips of cultivated and wild pineapple genotypes. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 124, n. 2, p. 351-360, 2016.

SOUZA, F.V.D.; DE SOUZA, E.H.; DA SILVA, R.L. Cryopreservation of Pollen Grains of Pineapple and Other Bromeliads. **Methods in Molecular Biology**, v. 1815, p. 279-288, 2018a.

SOUZA, F.V.D.; DE SOUZA, E.H.; KAYA, E.; DE JESUS VIEIRA, L.; DA SILVA, R.L. Cryopreservation of Pineapple Shoot Tips by the Droplet Vitrification Technique. **Methods in Molecular Biology**, v. 1815, p. 269-277, 2018b.

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

STEHMANN, J.R.; FORZZA, R.C.; SOBRAL, M.; SALINO, A.; KAMINO, L.H.Y. **Plantas da Floresta Atlântica**. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2009, 516 p.

TARRÉ, E.; MENDES, B.B.; GUIMARÃES, A.P.; 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.

VILLALOBOS, V. M.; ENGELMANN, F. Ex situ conservation of plant germoplasm using biotechnology. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 11, n. 4, p. 375-380, 1995.

VOLK, G. M.; WALTERS, C. Plant vitrification solution 2 lowers water content and alters freezing behavior in shoot tips during cryoprotection. **Cryobiology**, v. 52, n. 1, p. 48-61, 2006.

VOLK, G.M.; CASPERSEN, A.M. Cryoprotectants and components induce plasmolytic responses in sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) suspension cells. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 53, n. 4, p. 363–371, 2017.

VONDRAKOVA, Z.; CVIKROVÁ, M.; KATEŘINA, E. K.; MARTINCOVÁ, O.; VÁGNER, M. Cryotolerance in Norway spruce and its association with growth rates, anatomical features and polyamines of embryogenic cultures. **Tree Physiology**, v. 30, n. 10, p. 1335–1348, 2010.

Vriesea in **Flora do Brasil 2020 under construction**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Available at: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB6526>>. Acesso em: 01 Mar. 2019.

VUOSKU, J.; KARPPINEN, K.; MUILU-MÄKELÄ, R.; KUSANO, T.; SAGOR, G. H. M.; AVIA, K. Scots pine aminopropyl transferases shed new light on evolution of the polyamine biosynthesis pathway in seed plants. **Annals of Botany**, v. 121, n. 6, p. 1243–1256, 2018.

WEN, B.; CAI, C.; WANG, R.; SONG, S.; SONG, J. Cytological and physiological changes in recalcitrant Chinese fan palm (*Livistona chinensis*) embryos during cryopreservation. **Protoplasma**, v. 249, n. 2, p. 323–335, 2012.

WESLEY-SMITH, J.; WALTERS, C.; PAMMENTER, N.W.; BERJAK, P. Why is intracellular ice lethal? A microscopical study showing evidence of programmed cell death in cryo-exposed embryonic axes of recalcitrant seeds of *Acer saccharinum*. **Annals of botany**, v. 115, n. 6, p. 991-1000, 2015.

WYSE, S.V.; DICKIE, J.B.; WILLIS, K.J. Seed banking not an option for many threatened plants. **Nature Plants**, v. 4, p. 848–850, 2018.

XU, C.; WU, X.; ZHANG, H. Impact of D-Arg on drought resistance and endogenous polyamines in mycorrhizal *Pinus massoniana*. **J. Nanjing Forestry University**, v. 33, p. 19–23, 2009.

XU, L.; XING S.T.; SUN, X. Effects of polyamines on hormones contents and the relationship with the flower bud differentiation in chrysanthemum. **Plant Physiology Journal**, v. 50, n. 8, p. 1195–1202, 2014.

ZHANG, J.M.; ZHANG, X.N.; LU, X.X.; XIN, X.; YIN, G.K.; HE, J.J.; XU, Y.M.; CHEN, X.L. Optimization of droplet-vitrification protocol for carnation genotypes and ultrastructural studies on shoot tips during cryopreservation. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 36, n. 12, p. 3189–3198, 2014.

2 CAPÍTULO I: CRIOPRESERVAÇÃO DE CÁPSULAS DE *Vriesea reitzii* Leme & Costa E *Vriesea philippocoburgii* Wawra: ASPECTOS MORFOFISIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi criopreservar cápsulas de *Vriesea reitzii* Leme & Costa e *Vriesea philippocoburgii* Wawra e analisar características morfoanatômicas e bioquímicas decorrentes deste processo. Cápsulas foram coletadas em diferentes estágios de maturação, sendo classificadas em diferentes grupos de acordo com a umidade inicial das sementes. Após 24 h de armazenamento em NL, as cápsulas foram descongeladas em banho-maria a $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 min. As sementes foram removidas das cápsulas e inoculadas em meio de cultivo MS sem fitorreguladores. Parte das sementes foi utilizada para análises de microscopia e PAs. Germinação e índice de velocidade de germinação foram avaliados ao longo de 21 dias e a formação de plântulas normais foi avaliada após 60 dias de cultivo *in vitro*. A criopreservação das cápsulas promoveu a obtenção de sementes e plântulas livres de contaminação *in vitro*. Sementes de *V. reitzii* com menor teor de umidade (29%) resultaram em elevadas taxas de germinação (65%) e maior velocidade de germinação após a criopreservação. Por outro lado, sementes com 41 e 55% de umidade não germinaram após a criopreservação em decorrência de alterações celulares tais como, vacuolização intensa, autofagia, plasmólise e descompartimentalização celular. Sementes criopreservadas de *V. philippocoburgii* apresentaram elevada taxa de germinação (97%), não diferindo das sementes não criopreservadas (99%). Entretanto, o percentual de plântulas normais obtido a partir de sementes criopreservadas (73%) foi inferior ao percentual obtido a partir de sementes não criopreservadas (91%). Observou-se um incremento nas concentrações de Put em sementes criopreservadas de ambas espécies, sugerindo seu papel na tolerância contra danos decorrentes do congelamento. Maiores concentrações de Spd e Spm também foram encontradas em sementes de *V. reitzii*.

Palavras-chave: Alterações morfológicas. Bromeliaceae. Criogenia. Morte celular programada. Putrescina.

ABSTRACT

The objective of the present work was to cryopreserve capsules of *Vriesea reitzii* Leme & Costa and *Vriesea philippocoburgii* Wawra and to analyze morpho-anatomical and biochemical characteristics resulting from this process. Capsules were collected in different stages of maturation, being classified in different groups according to the initial moisture of the seeds. After 24 h of storage in LN, the capsules were thawed in a water bath at $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 2 min. The seeds were removed from the capsules and inoculated in MS culture medium without phytohormones. Some of the seeds were used for analysis of microscopy and PAs. Germination and the germination speed index were evaluated over 21 days and formation of normal seedlings was evaluated after 60 days of in vitro culture. The cryopreservation of the capsules promoted the getting of seeds and seedlings free of contamination in vitro. Seeds of *V. reitzii* cryopreserved with lower moisture content (29%) resulted in high germination rates (65%) and higher germination speed index. On the other hand, seeds with 41 and 55% moisture did not germinate after cryopreservation due to cellular alterations such as intense vacuolization, autophagy, plasmolysis and cellular decompartmentalization. Cryopreserved seeds of *V. philippocoburgii* presented a high germination rate (97%), not differing from non-cryopreserved seeds (99%). However, the percentage of normal seedlings obtained from cryopreserved seeds (73%) was lower than the percentage obtained from non-cryopreserved seeds (91%). It was observed an increase in the concentrations of Put in cryopreserved seeds of both species, suggesting its role in the tolerance against damages due to freezing. Higher concentrations of Spd and Spm were also found in *V. reitzii* seeds.

Keywords: Bromeliaceae. Cryogenic. Morphological changes. Programmed cell death. Putrescine.

2.1 INTRODUÇÃO

O bioma Mata Atlântica é um *Hotspot* mundial de biodiversidade (MYERS et al., 2000). Este bioma é abrigo da família Bromeliaceae, uma das mais ricas e diversas do continente americano (GIVNISH et al., 2011). As espécies desta família são importantes componentes bióticos, pois contribuem de forma considerável para a biodiversidade das comunidades onde habitam (MARTINELLI et al., 2008; DÉZERARD et al., 2018). No entanto, o número de espécies ameaçadas tem aumentado devido ao extrativismo ilegal e a progressiva devastação de seus habitats (MARTINELLI et al., 2008).

V. reitzii Leme e Costa é uma bromélia epífita e endêmica, ocorrendo no sul do Brasil nos domínios da Floresta Ombrófila Mista, distribuindo-se em altitudes entre 750 e 1.200 m (LEME e COSTA, 1991). A espécie é altamente vulnerável, pois *Araucaria angustifolia*, seu habitat epífita primário, teve suas populações naturais extremamente reduzidas (KLEIN, 1990; LEME e COSTA, 1991). De acordo com o Centro Nacional de Conservação da Flora (CNCFlora), *V. reitzii* encontra-se na categoria de “Quase ameaçada” (NT) de extinção. *V. philippocoburgii* Wawra, por sua vez, é uma espécie epífita e endêmica do Brasil, presente nos estados do RJ, SP, PR, SC e RS (FORZZA et al., 2015). Encontra-se na categoria de “Menos preocupante” (LC), de acordo com o CNCFlora. O fruto de ambas as espécies consiste em uma cápsula septicida e as sementes são fusiformes e possuem apêndices plumosos que lembram paraquedas (COSTA et al., 2014).

A criopreservação é uma ferramenta promissora para a conservação *ex situ* a longo prazo da diversidade genética de bromélias (WYSE et al., 2018), sendo bastante utilizada no armazenamento de sementes pequenas e tolerantes à dessecação (PRITCHARD, 2004). Consiste no armazenamento de materiais biológicos em temperaturas ultrabaixas (-196°C), as quais interrompem a divisão celular e a maioria dos processos metabólicos e físicos (GONZÁLEZ-ARNAO; ENGELMANN, 2013). Esta ferramenta apresenta vantagens em relação a outros métodos, tais como, menor necessidade por espaço e mão-de-obra e menor risco de variações somaclonais e de instabilidade genética (ENGELMANN e DRUSSERT, 2013).

Existem poucas informações sobre os procedimentos de criopreservação em bromélias endêmicas da Mata Atlântica. Tais informações são essenciais no desenvolvimento de programas eficazes para a conservação da flora nativa (RODRIGUES et al., 2014). Umidades entre 10 e 30% em geral, diminuem a sobrevivência das sementes após a

criopreservação devido à formação de cristais de gelo durante os processos de congelamento e descongelamento (STANDWOOD, 1985). Entretanto, Tarré et al (2007) obteve sucesso na criopreservação de sementes de bromélias que apresentavam esta faixa de umidade.

A obtenção de plântulas livres de contaminação é extremamente importante após a criopreservação. Porém, algumas espécies de bromélias, como *V. reitzii*, apresentam elevadas taxas de contaminação *in vitro* quando se utilizam sementes livres dos frutos, mesmo após a desinfestação. Estas informações foram observadas em ensaios preliminares com criopreservação de sementes livres desta espécie, onde praticamente 100% das sementes contaminaram durante a introdução *in vitro*. Os apêndices plumosos presentes nestas sementes podem ser a fonte destas contaminações, as quais são adquiridas durante o manuseio das sementes. Uma solução simples para este problema poderia ser a criopreservação das cápsulas ao invés das sementes livres.

O sucesso na criopreservação pode estar relacionado com aspectos bioquímicos e anatômicos das sementes. Estudos anatômicos têm sido aliados da criobiologia. Contudo, estes estudos ainda não foram abordados em sementes de bromélias submetidas ao armazenamento criogênico. Dentre os aspectos bioquímicos, as PAs apresentam um papel importante neste processo. PAs são bases nitrogenadas alifáticas de baixo peso molecular contendo dois ou mais grupos amino, as quais apresentam atividade biológica potente (XU et al., 2009; VUOSKU et al., 2018; CHEN et al., 2019). Put, Spd e Spm são as principais PAs em plantas, e estão envolvidas na regulação de diversos processos fisiológicos e do desenvolvimento, como a MCP e a tolerância a estresses ambientais (HUSSAIN et al., 2011, MOSCHOU e ROUBELAKIS-ANGELAKIS, 2014, MINOCHA et al., 2014, SHI e CHAN 2014; XU et al., 2014; MUSTAFAVI et al., 2018; CHEN et al., 2019).

Os objetivos do presente trabalho foram: (1) criopreservar cápsulas de *V. reitzii* e *V. philippocoburgii*, visando especialmente eliminar a contaminação durante a introdução *in vitro* das sementes; (2) criopreservar as cápsulas mantendo sua umidade inicial; (3) ilustrar possíveis alterações morfoanatômicas decorrentes da criopreservação nestas condições; e (4) comparar as concentrações de PAs livres nas sementes não criopreservadas e criopreservadas.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil.

2.2.1 Material vegetal

Cápsulas de *V. reitzii* foram coletadas durante a maturidade fisiológica, a partir de plantas matrizes localizadas em Curitiba, altitude 990 m (Santa Catarina, Brasil 27°16'58''S–50°35'04''W), em abril de 2018. As cápsulas foram classificadas em três estágios de maturação de acordo com a posição na inflorescência. Cápsulas de *V. philippocoburgii* foram coletadas na maturação de colheita a partir de plantas localizadas em Florianópolis, altitude 14 m (Santa Catarina, Brasil S27°35'40''S–48°30'21''W), em setembro de 2018.

As cápsulas foram desinfestadas em etanol 70% por 10 min., seguido por solução de hipoclorito de sódio (2% de cloro ativo) com Tween®20 por 40 min., seguido por três lavagens com água destilada estéril. Após, os frutos foram secos sobre papel filtro estéril em câmara de fluxo laminar durante 60 min. Sementes obtidas a partir de três frutos de cada estágio de maturação e espécie foram utilizadas para caracterização da umidade inicial através do método gravimétrico em estufa a 105 ± 3 °C por 24h (ISTA, 2005). A umidade inicial das sementes de *V. reitzii* foi considerada como tratamento.

2.2.2 Criopreservação

Cápsulas não criopreservadas (controle) foram armazenadas em criotubos a 4 °C. Cápsulas criopreservadas, por sua vez, foram colocadas em criotubos (5mL), seguido por armazenamento em tanque contendo NL. Após 24 h, os criotubos foram retirados do NL e descongelados em banho-maria a 40 °C por 2 min. Em câmara de fluxo laminar, sementes oriundas de cápsulas criopreservadas e não criopreservadas tiveram seus apêndices plumosos removidos. Após, as sementes foram inoculadas sobre pontes de papel filtro, em tubos de ensaio (22 x 150 mm) contendo 15 mL de meio de cultura líquido composto pela formulação salina MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) (*V. reitzii*) e em tubos de ensaio contendo 15 mL de meio de cultura MS gelificado com 2g L⁻¹ de Phytigel® (*V. philippocoburgii*). Os meios foram enriquecidos com vitaminas de Morel (MOREL e WETMORE, 1951) e sacarose (30 g L⁻¹

¹). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 antes de ser esterilizado em autoclave a 1,3 atm por 15 min. a 121°C. As sementes foram mantidas em sala de crescimento a 25 ± 2 °C com fotoperíodo de 16 h e intensidade luminosa de 50–60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

2.2.3 Germinação e velocidade de germinação

A germinação foi avaliada diariamente por um período de 21 dias. A ruptura do tegumento e a protrusão do hipocótilo foram os parâmetros utilizados para caracterizar uma semente germinada (CHILPA-GALVÁN et al., 2018). O índice de velocidade de germinação (IVG) foi calculado através da seguinte fórmula proposta por Maguire (1962): $IVG = (G1/N1) + (G2/N2) + \dots + (Gn/Nn)$, onde: G= número de sementes germinadas em determinada contagem; N= número de dias da semeadura à 1^a, 2^a, ... 21^a avaliação. O percentual de plântulas normais formadas em relação ao percentual de germinação foi avaliado 60 dias após a inoculação das sementes *in vitro*.

2.2.4 Microscopia óptica e histologia

Amostras de sementes *V. reitzii* e *V. philippocoburgii* de cada tratamento foram fixadas em glutaraldeído (2,5%) em tampão fosfato 0,2 M (pH 7,2) (1:1) por uma semana. Após a fixação, as amostras foram lavadas três vezes em tampão fosfato, por 30 min. (BOUZON, 2006), e desidratadas em série etílica gradual (SANDERS et al., 1999). Após a desidratação, as amostras foram pré-infiltradas em historesina (Leica® HistoResin, Heidelberg, Alemanha) e etanol PA (1:1) por uma semana e infiltradas com historesina por uma semana. Secções transversais (5 μm) da região embrionária foram obtidas com micrótomo Slee Technik®, distendido em lâminas com gota de água, e mantido a uma temperatura de 42 ± 2 °C. Após a evaporação da água, as secções foram submetidas à coloração com azul de toluidina (O'BRIEN et al., 1965). Aspectos relevantes foram identificados e capturados utilizando microscópio de fluorescência Leica DM5500 B.

2.2.5 Poliaminas livres

PAs livres foram determinadas a partir de amostras de sementes (aproximadamente 90 mg MF) de cada tratamento para ambas espécies de acordo com Silveira et al. (2004). As amostras foram maceradas em 1,4 mL de ácido perclórico a 5% (v/v) e as PAs livres foram extraídas e

dansiladas. Em seguida, as PAs livres foram derivatizadas com cloreto de dansila e identificadas por HPLC, utilizando-se uma coluna C18 de fase reversa de 5 μm (Shimadzu[®] Shim-pack CLC ODS). O gradiente de acetonitrila absoluta foi programado para 65% nos primeiros 10 min., de 65 para 100% para 10 e 13 min. e 100% para 13 e 21 min., usando 1 mL min^{-1} de fluxo a 40°C. A concentração de PAs foi determinada usando um detector de fluorescência a 340 nm (excitação) e 510 nm (emissão). As áreas dos picos e os tempos de retenção foram medidos por comparação com PAs padrão: Put, Spd e Spm. O 1,7-diaminoheptano (DAH) foi utilizado como padrão interno.

2.2.6 Delineamento experimental e análise estatística

Dois delineamentos experimentais foram estabelecidos nos experimentos de criopreservação. Para *V. reitzii*, utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3 x 2 (umidade inicial das sementes x com ou sem exposição ao NL), com três repetições. Cada unidade experimental consistiu em um tubo de ensaio, contendo cinco sementes. Para *V. philippocoburgii*, o delineamento utilizado foi inteiramente casualizado com dois tratamentos (com ou sem exposição ao NL), quatro repetições e oito unidades experimentais (um tubo de ensaio contendo cinco sementes). Para a determinação de PAs, foram utilizadas três repetições para cada tratamento considerado.

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias separadas pelo teste Tukey (5%). Utilizou-se o programa Statistica[®] (Statsoft Inc., Tulsa, OK, EUA) para Windows[®] versão 7.0. Para atender aos pressupostos da análise de variância, os dados de germinação, IVG e percentual de plântulas normais foram transformados para a função arco seno. Concentrações de Spm em *V. reitzii* foram transformadas em escala logarítmica de acordo com Compton (1994).

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Aspectos morfofisiológicos

2.3.1.1 *Vriesea reitzii*

Observou-se uma interação significativa entre criopreservação e teor de umidade nas sementes de *V. reitzii* para todas as variáveis analisadas. Quanto menor o teor de umidade, melhor o estado fisiológico das sementes após a criopreservação, refletindo em maior percentual e

velocidade de germinação, bem como maior sobrevivência de plântulas. De modo geral, as sementes criopreservadas apresentaram menor percentual de germinação e IVG. Por sua vez, sementes criopreservadas com 29% de umidade apresentaram 65% de germinação e 39% de plântulas normais (Tabela 1). As sementes que apresentavam umidades mais elevadas, 41 e 55%, não germinaram após a criopreservação (Tabela 1). Assim, pode-se inferir que 29% de umidade seria o limite máximo para a criopreservação de sementes desta espécie. Sementes com maior teor de umidade também apresentaram menor IVG, em ambos os tratamentos de criopreservação, conforme foi possível observar em sementes não criopreservadas (-NL) (Tabela 1).

Em relação a integridade morfológica das plântulas, não foram observadas alterações entre plântulas oriundas de sementes criopreservadas com 29% de umidade (Fig. 1a) e sementes não criopreservadas (Fig. 1b). Contudo, as plântulas oriundas de sementes criopreservadas apresentaram menor crescimento devido ao menor IVG (Tabela 1).

2.3.1.2 *Vriesea philippocoburgii*

Sementes de *V. philippocoburgii*, as quais apresentavam 12% de umidade média mantiveram um elevado percentual de germinação após a criopreservação (+NL), não diferindo das sementes não criopreservadas (-NL) (Tabela 1). Por sua vez, o IVG e o percentual de plântulas normais diminuíram com o armazenamento em NL. Apesar de inferior, a obtenção de 73% das plântulas íntegras morfológicamente está acima dos valores estabelecidos pela EMBRAPA (50%), como percentual mínimo aceitável de regeneração e desenvolvimento após a criopreservação (SANTOS et al., 2015). Do ponto de vista morfológico, as plântulas oriundas de sementes criopreservadas (Fig. 1c) não diferiram das plântulas oriundas de sementes não criopreservadas (Fig. 1d).

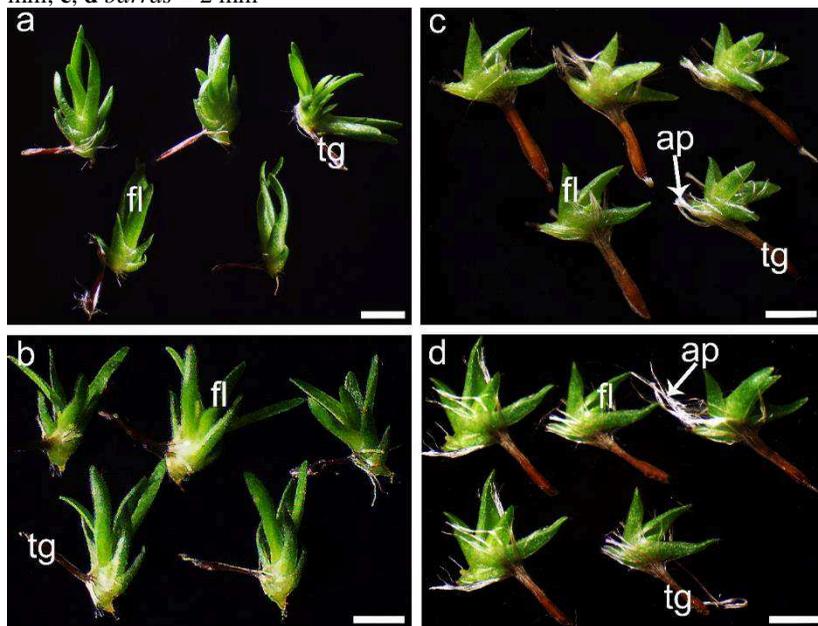
Além disso, cabe ressaltar que não ocorreu contaminação fúngica ou bacteriana durante o estabelecimento *in vitro* das espécies. Por outro lado, durante alguns ensaios prévios, a remoção das sementes das cápsulas antes do procedimento de criopreservação resultava em praticamente 100% de contaminação, dificultando a obtenção de plântulas sadias.

Tabela 1 - Taxa de germinação, índice de velocidade de germinação (IVG) e percentual de plântulas normais de *Vriesea reitzii* (*V. r*) e *Vriesea philippocoburgii* (*V. p*) em função do armazenamento e do teor de umidade das sementes. Sementes não criopreservadas (-NL) e sementes criopreservadas (+NL)

Espécie	Umidade inicial (%)	Germinação (%)		IVG		Plântulas normais (%)	
		-NL	+NL	-NL	+NL	-NL	+NL
<i>V. r</i>	29	100Aa	65Ab	30,4Aa	4,8Ab	96Aa	39Ab
	41	97Aa	0Bb	26,6Ba	0Bb	92Aa	0Bb
	55	99Aa	0Bb	21,9Ca	0Bb	96Aa	0Bb
<i>V. p</i>	12	99a	97a	64,2a	57,5b	91a	73b

Média de três repetições. Médias seguidas por letras diferentes, maiúsculas na coluna e minúsculas na linha, diferem entre si pelo teste Tukey (5%). Fonte: PRADELLA (2019).

Figura 1 - Plântulas de *Vriesea reitzii* e *Vriesea philippocoburgii* após 120 e 45 dias de cultivo em meio MS, respectivamente. Plântulas de *Vriesea reitzii* obtidas de: **a** Sementes não criopreservadas e **b** Criopreservadas. Plântulas de *Vriesea philippocoburgii* obtidas de: **c** Sementes não criopreservadas e **d** Criopreservadas. *tg* tegumento; *fl* folhas; *ap* apêndices plumosos; **a, b** barras = 3 mm; **c, d** barras = 2 mm



Fonte: PRADELLA (2019).

2.3.2 Aspectos anatômicos e bioquímicos

Tendo em vista que as sementes contendo 41 e 55% de umidade não germinaram após a criopreservação, as sementes pertencentes a estes grupos foram misturadas e as análises anatômicas e bioquímicas realizadas a partir de dois grupos apenas, sendo: o grupo com 29% e o grupo com 41-55% de umidade.

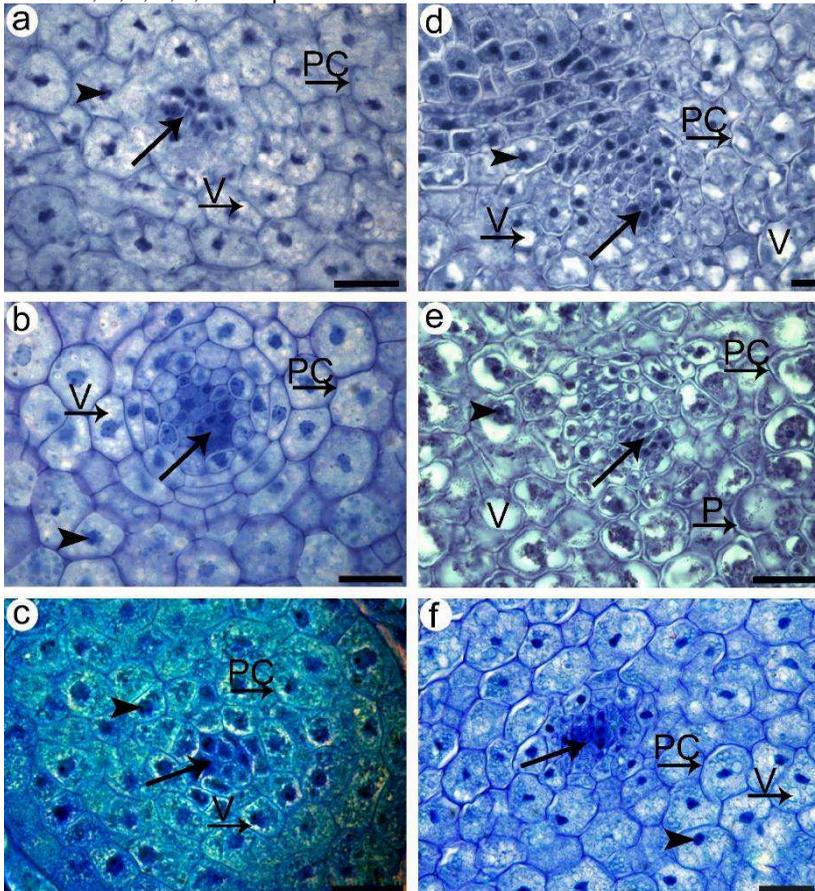
Seções transversais dos embriões, obtidas a partir da microscopia de luz corroboram com os resultados morfofisiológicos previamente descritos. Sementes de *V. reitzii* não submetidas ao NL apresentaram células estruturalmente preservadas, independente do teor de umidade. Tais células continham citoplasma denso, pequenos e numerosos vacúolos e núcleo evidente (Figs. 2a, b). Este mesmo padrão foi observado em sementes não criopreservadas de *V. philippocoburgii* (Fig.

2c). Neste caso, o citoplasma apresentou coloração mais intensa indicando maior mobilização de reservas do endosperma para o embrião.

Sementes de *V. reitzii* criopreservadas com 29% de umidade (Fig. 2d) apresentaram algumas células preservadas, principalmente na região próxima ao procâmbio. Contudo, na maioria das células observou-se vacuolização, aumento da proporção do citoplasma ocupada por vacúolos e retração citoplasmática, indicando plasmólise celular.

A criopreservação de sementes de *V. reitzii* em umidades mais elevadas (41-55%) promoveu intensa degradação celular (Fig. 2e). Praticamente todas as células estavam plasmolisadas. Observou-se intensa vacuolização, indicando avanços no processo de autofagia. Em algumas células o rompimento da membrana plasmática, seguido por vazamento do conteúdo celular também foi verificado. A visualização do núcleo ficou comprometida devido a degradação celular. Sementes criopreservadas de *V. philippocoburgii*, por sua vez, apresentaram estrutura celular semelhante à descrita para as sementes não criopreservadas (Fig. 2f).

Figura 2 - Análise histológica de seções transversais de embriões zigóticos de *Vriesea reitzii* e *Vriesea philippocoburgii*. **a, b** Células embrionárias de sementes oriundas de cápsulas de *Vriesea reitzii* não criopreservadas contendo 29 e 41-55% de umidade, respectivamente. **c** Células embrionárias de sementes contendo 12% de umidade oriundas de cápsulas de *Vriesea philippocoburgii* não criopreservadas **d, e** Células embrionárias de sementes contendo 29 e 41-55% de umidade, respectivamente, oriundas de cápsulas criopreservadas de *Vriesea reitzii*. **f** Células embrionárias de sementes contendo 12% de umidade oriundas de cápsulas de *Vriesea philippocoburgii* criopreservadas. PC parede celular; P plasmólise; V vacuolização; *ponta de seta preta* núcleo; *seta preta* procâmbio; *barras a, b, c, d, e, f* = 20 μ m



Fonte: PRADELLA (2019).

A interação entre umidade e criopreservação analisada para *V. reitzii* não foi significativa. Portanto, cada variável foi apresentada de forma independente (Tabelas 2 e 3). O armazenamento em NL promoveu um incremento nas concentrações de Put, Spd e Spm, possivelmente relacionado com mecanismos de defesa a estresse por baixas temperaturas (Tabela 2).

Em relação aos diferentes teores de umidade, o nível de Put se manteve estável. Houve um incremento expressivo nas concentrações de Spd nas sementes mais úmidas. Por sua vez, as concentrações de Spm foram mais elevadas em sementes com menor teor de umidade (Tabela 3). Em *V. philippocoburgii*, as concentrações de Put foram mais elevadas em resposta ao armazenamento em NL, assim como observado para *V. reitzii*. Este comportamento resultou em uma maior razão Put/(Spd+Spm). As demais PAs mantiveram-se estáveis em ambos os tratamentos (Tabela 4).

Tabela 2 - Poliaminas livres em *Vriesea reitzii* em função do tipo de armazenamento. Sementes não criopreservadas (-NL) e sementes criopreservadas (+NL)

Armazenamento	Poliaminas livres ($\mu\text{g g}^{-1}\text{MF}$)				
	Put	Spd	Spm	Total	Put/(Spd+Spm)
-NL	6,37b	8,33b	5,79b	20,49b	0,45a
+NL	10,05a	10,51a	11,05a	31,61a	0,47a

Média de três repetições. Médias seguidas por letras diferentes nas colunas diferem entre si pelo teste F (5%). Fonte: PRADELLA (2019).

Tabela 3 - Poliaminas livres em *Vriesea reitzii* em função do teor de umidade

Teor de umidade (%)	Poliaminas livres ($\mu\text{g g}^{-1}\text{MF}$)				
	Put	Spd	Spm	Total	Put/(Spd+Spm)
29	8,54a	10,37a	7,03b	25,95a	0,49a
41-55	7,88a	8,47b	9,80a	26,15a	0,43a

Média de três repetições. Médias seguidas por letras diferentes nas colunas diferem entre si pelo teste F (5%). Fonte: PRADELLA (2019).

Tabela 4 - Poliaminas livres em sementes de *Vriesea philippocoburgii* em função do armazenamento. Sementes não criopreservadas (-NL) e sementes criopreservadas (+NL)

Teor de umidade (%)	Armazenamento	Poliaminas livres ($\mu\text{g g}^{-1}$ MF)				
		Put	Spd	Spm	Total	Put/(Spd+Spm)
12	-NL	4,71b	6,51a	1,69a	12,90a	0,58b
	+NL	6,29a	7,20a	1,41a	14,89a	0,73a

Média de três repetições. Médias seguidas por letras diferentes nas colunas diferem entre si pelo teste F (5%). Fonte: PRADELLA (2019).

2.4 DISCUSSÃO

2.4.1 Qualidade fisiológica das sementes

O teor de água é um dos principais fatores que afetam a sobrevivência das sementes após o armazenamento em NL. Portanto, as sementes tolerantes à dessecação precisam ser secas abaixo do Teor de Umidade Limite para a Criopreservação (TULC) antes do resfriamento e do armazenamento em temperaturas abaixo de zero. Teores de umidade abaixo desse limite permitem que a água remanescente passe para o estado vítreo, evitando a formação de gelo intracelular. Por outro lado, umidades acima deste limite podem acarretar perdas significativas na viabilidade das sementes (PRITCHARD, 2007; BENSON, 2008).

Resultados fisiológicos das sementes de bromélias obtidos neste estudo indicam que para *V. reitzii*, os valores iniciais de umidade estavam acima do limite referido anteriormente, o que resultou em perdas significativas na germinação e na velocidade de germinação das sementes. No caso de *V. philippocoburgii*, as sementes estavam de acordo com a faixa de umidade indicada por alguns autores para a criopreservação de sementes ortodoxas (8-13%) (PRITCHARD e NADARAJAN, 2008; HUGHES e KANE, 2018) e apesar disso, foram observadas perdas na velocidade de germinação e no percentual de plântulas normais.

O TULC varia para cada espécie, estando em torno de 10% (PRITCHARD, 2007). Segundo Standwood (1985), o teor de umidade variando entre 10% e 30% pode diminuir a viabilidade de sementes após a criopreservação devido a formação de gelo intracelular durante o congelamento e/ou descongelamento. Hor et al. (2005) indicam uma relação inversa entre o conteúdo de água não congelável e o conteúdo de

lipídios nas sementes. Ou seja, sementes ricas em lipídios, como é relatado em algumas bromélias do gênero *Vriesea* (CORREDOR-PRADO et al., 2014) precisam ser mais dessecadas quando comparadas a sementes com menor conteúdo lipídico. Isso pode explicar por que, mesmo com 12% de umidade, sementes de *V. philippocoburgii* apresentaram menor velocidade de germinação e menor formação de plântulas normais quando criopreservadas.

A maioria dos estudos de criopreservação com sementes de bromélias utilizaram teores de umidade abaixo de 10% (PEREIRA et al., 2010; HMELJEVSKI et al., 2014; RODRIGUES et al., 2014; FERRARI et al., 2016). No entanto, Tarré et al. (2007) criopreservou sementes de *Encholirium heloisae* e *Dyckia ursina* com 19 e 28%, respectivamente e não observou diferenças no percentual de germinação em relação a sementes não criopreservadas. Este estudo demonstra que as espécies podem ter diferentes respostas em relação ao TULC aceitável.

Durante o desenvolvimento, o teor de água das sementes diminui gradualmente e à medida que a maturação se aproxima, a dessecação é o evento final para as sementes ortodoxas (BEWLEY et al., 2013). Frutos de *V. reitzii* foram coletados na maturidade fisiológica, portanto ainda não haviam passado pela rápida desidratação que acompanha o final da maturação das sementes. Este fator permitiu com que observássemos menor IVG em sementes mais úmidas (Tabela 1; -LN). Sementes de *V. philippocoburgii*, coletadas durante a dispersão natural, considerada maturidade de colheita, apresentaram maior IVG, pois o vigor em sementes ortodoxas aumenta logo após a rápida perda de água associada à dessecação por maturação (BEWLEY et al., 2013).

2.4.2 Aspectos anatômicos

A formação de gelo intracelular é um dos principais problemas relacionados com a baixa sobrevivência das plantas após a criopreservação. Os cristais de gelo podem ser letais por causarem danos na membrana celular (STEPONKUS et al., 1993) ou danos associados com a compressão dos constituintes celulares (SARAGUSTY et al., 2009). Portanto, fatores como taxa de resfriamento/aquecimento, composição de crioprotetores e conteúdo de água celular têm sido manipulados a fim de evitar este problema (BENSON, 2008; LIU et al., 2012).

Danos observados nas células dos embriões criopreservados com maior conteúdo de água (Fig. 2e), os quais não sobreviveram após a criopreservação, provavelmente decorreram da maior formação de

cristais de gelo. Analisando-se as células de embriões criopreservados com menor conteúdo de água, verificou-se que muitas células também ficaram comprometidas. No entanto, células de tecidos meristemáticos, mais precisamente do procâmbio ou próximas a este, apresentaram-se mais preservadas. Estas regiões possivelmente foram responsáveis por garantir a germinação das sementes. Outros autores também observaram recrescimento a partir de células meristemáticas e do procâmbio (WESLEY-SMITH et al., 2015). Portanto, a suscetibilidade ao dano pode ser específica do tipo celular, ou seja, células mais vacuolizadas e diferenciadas como é o caso das células parenquimáticas podem ser mais sensíveis ao congelamento (VOLK e CASPERSEN, 2007).

O aumento da vacuolização e da fusão vacuolar tem sido reportados em diversas espécies, em resposta a criopreservação (WESLEY-SMITH et al., 2001a; SERSHEN et al., 2012a, b). Em células do eixo embrionário de sementes recalcitrantes sob estresse por dessecação e/ou osmótico, estes eventos precederam a autofagia (WESLEY-SMITH et al., 2001b). A morte celular autofágica, também referida como morte celular vacuolar (DENTON et al., 2012), geralmente se manifesta por uma diminuição gradual no volume do citoplasma e um aumento concomitante no volume ocupado pelos vacúolos líticos. O envolvimento do citoplasma por vacúolos líticos, com posterior degradação dos constituintes celulares é um dos principais mecanismos de desmantelamento celular durante a morte celular vacuolar (VAN DOOR et al., 2011). A autofagia também tem sido caracterizada como uma via de degradação regulada de forma fina e específica para remoção de componentes citosólicos indesejados e organelas danificadas (GATICA et al., 2018).

O aumento na vacuolização não foi visualmente observado em células embrionárias criopreservadas de *V. philippocoburgii* (Fig. 2f). Quando os cristais de gelo formados são pequenos ($\leq 0,4 \mu\text{m}$ de diâmetro) e ficam distribuídos no citoplasma, podem não causar danos físicos imediatos às células (WESLEY-SMITH et al., 2014), mas eles podem induzir sinais para a MCP. Neste caso, quanto maior for o número de cristais de gelo intracelular formados durante o resfriamento, maior será a velocidade de resposta ao sinal de MCP (WESLEY-SMITH et al., 2015). Isso pode explicar por que algumas sementes foram capazes de germinar, mas não completaram seu desenvolvimento normal.

2.4.3 Poliaminas livres

Diversos estudos têm abordado o papel desempenhado por PAs em plantas sob estresses abióticos (LIU et al., 2015; HANDA et al., 2018; MUSTAFAVI et al., 2018; CHEN et al., 2019), especialmente sob temperaturas baixas (ALCÁZAR et al., 2011; PÁL et al., 2015). Contudo, apesar do grande interesse no metabolismo das PAs em plantas expostas a esses estresses, há pouca informação sobre o papel do metabolismo da PAs no processo de criopreservação.

De acordo com nossas observações, a concentração de PAs foi maior em sementes criopreservadas, especialmente de Put, as quais foram maiores nas duas espécies estudadas (Tabelas 2 e 4). Concentrações mais elevadas de PAs, especialmente Put também foram encontradas em outros trabalhos envolvendo criopreservação. Ramon et al. (2002) observaram aumento de Put em células meristemáticas de *Musa* spp. sobreviventes após o armazenamento em NL. Cuevas et al. (2008) demonstraram o envolvimento de Put na tolerância ao congelamento em *Arabidopsis*. Por fim, Shi et al. (2013) apresentaram que o acúmulo de Put e Spm, modulado pela manipulação da expressão de arginase, enzima importante envolvida no metabolismo da arginina (precursora das PAs), aumentou a tolerância de *Arabidopsis* às tensões de sal, seca e congelamento.

Além das maiores concentrações de Put em sementes criopreservadas de *V. reitzii*, relatamos também maiores concentrações de Spd. Estudos sugerem uma ligação entre Spd e a ocorrência de morte celular vacuolar (MOSCHOU e ROUBELAKIS-ANGELAKIS et al., 2014). Conforme discutido no item anterior, características de morte celular foram observadas em células embrionárias de sementes criopreservadas de *V. reitzii*.

Por fim, as concentrações de Spd e Spm diferiram em relação ao teor de umidade das sementes. Nossa hipótese para este resultado é que a Spd e a Spm podem atuar em diferentes concentrações ao longo do processo de maturação das sementes. Pieruzzi et al. (2011) relataram que Spd e Spm poderiam desempenhar um papel mais importante no processo de germinação de sementes do que Put. Além disso, diversos relatos demonstram que a aplicação exógena de PAs afetaram positivamente a germinação, o vigor das plântulas, bem como o crescimento e desenvolvimento posteriores (MUSTAFAVI et al., 2018).

2.5 CONCLUSÃO

A criopreservação das sementes dentro da cápsula foi possível, garantindo um percentual germinação e formação de plântulas normais aceitável, especialmente para *V. philippocoburgii*. A utilização da cápsula fechada ao invés das sementes livres eliminou a incidência de contaminação durante o estabelecimento *in vitro*. As cápsulas podem ser criopreservadas sem a dessecação prévia somente quando a coleta for realizada no período de dispersão natural das sementes. Alterações na estrutura celular tais como plasmólise, vacuolização intensa seguida por autofagia, ruptura da membrana celular, foram observadas em sementes que estavam com a umidade acima do recomendado para a criopreservação. O incremento nas concentrações de Put em sementes criopreservadas sugere a atuação desta PA na tolerância ao congelamento.

REFERÊNCIAS

- ALCAZAR, R.; CUEVAS, J.C.; PLANAS, J.; ZARZA, X.; BORTOLOTTI, C.; CARRASCO, P.; SALINAS, J.; TIBURCIO, A.F.; ALTABELLA, T. Integration of polyamines in the cold acclimation response. **Plant Science**, v. 180, n. 1, p. 31-38, 2011.
- BARFUSS, M.H.J.; TILL, W.; LEME, E.M.C.; PINZÓN, J.P.; MANZANARES, J.M.; HALBRITTER, H.; SAMUEL, R.; BROWN, G.K. Taxonomic revision of Bromeliaceae subfam. Tillandsioideae based on a multi-locus DNA sequence phylogeny and morphology. **Phytotaxa**, v. 279, n. 1, 2016.
- BENSON, E.E. Cryopreservation of phytodiversity: a critical appraisal of theory and practice. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 27, n. 3, p. 141-219, 2008.
- BEWLEY, J.D.; BRADFORD, K.; HILHORST, H.; NONOGAKI, H. **Seeds - Physiology of Development, Germination and Dormancy**. New York: Springer-Verlag, 2013.
- BOUZON, Z.L. Histoquímica e ultra-estrutura da ontogênese dos tetrasporângios de *Hypnea musciformis* (Wulfen) J. V. Lamour. (Gigartinales, Rhodophyta). **Revista brasileira de Botânica**, v. 29, p. 229-238, 2006. doi: 10.1590/S0100-84042006000200004.
- CHEN, D.; SHAO, Q.; YIN, L.; YOUNIS, A.; ZHENG, B. Polyamine Function in Plants: Metabolism, Regulation on Development, and Roles in Abiotic Stress Responses. **Frontiers in plant science**, v. 9, p. 1945, 2019.
- CHILPA-GALVÁN, N.; MÁRQUEZ-GUZMÁN, J.; ZOTZ, G.; ECHEVARRÍA-MACHADO, I.; ANDRADE, J. L.; ESPADAS-MANRIQUE, C.; REYES-GARCÍA, C. Seed traits favouring dispersal and establishment of six epiphytic Tillandsia (Bromeliaceae) species. **Seed Science Research**, v. 28, n. 4, p. 349-359, 2018.
- CNCFlora. *Vriesea philippocoburgii* in Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012.2 Centro Nacional de Conservação da Flora. Disponível em <<http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Vriesea-philippocoburgii>>. Acesso em 27 fevereiro 2019.

CNCFlora. *Vriesea reitzii* in Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012.2 Centro Nacional de Conservação da Flora. Disponível em <http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Vriesea_reitzii>. Acesso em 27 fevereiro 2019.

COMPTON, M. Statistical methods suitable for the analysis of plant tissue culture data. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v.37, n. 3, p.217–242, 1994.

CORREDOR-PRADO, J.P.; SCHMIDT, E.C.; STEINMACHER, D. et al. Seed morphology of *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* L.B. Sm. (Bromeliaceae). **Hoehnea**, v. 41, n. 4, p. 553–562, 2014.

COSTA, A.F.; GOMES-DA-SILVA, J.; WANDERLEY, M.G.L. *Vriesea* (Bromeliaceae, Tillandsioideae): taxonomic history, and morphology of the Brazilian lineage. **Journal of the Torrey Botanical Society**, v, 141, n. 4, p. 338-352, 2014. DOI: 10.3159/TORREY-D-13-00070.1.

CUEVAS, J.C.; LÓPEZ-COBOLLO, R.; ALCÁZAR, R.; ZARZA, X.; KONCZ, C.; ALTABELLA, T.; SALINAS, J.; TIBURCIO, A.F.; FERRANDO, A. Putrescine is involved in *Arabidopsis* freezing tolerance and cold acclimation by regulating abscisic acid levels in response to low temperature, **Plant Physiology**, v. 148, n. 2, p. 1094–1105, 2008.

DENTON, D.; NICOLSON, S; KUMAR, S. Cell death by autophagy: facts and apparent artefacts. **Cell Death and Differentiation**, v. 19, n. 1, p. 87–95, 2012.

DÉZERALD, O.; LEROY, C.; CORBARA, B.; DEJEAN, A.; TALAGA, S.; CÉRÉGHINO, R. Tank bromeliads sustain high secondary production in neotropical forests. **Aquatic Sciences**, v. 80, n. 14, Jan. 2018.

ENGELMANN, F.; DUSSERT, S. Cryopreservation. In: NORMAH, M.; CHIN, H.; REED, B. (eds). **Conservation of Tropical Plant Species**. Springer, New York, NY, 2013.

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

GATICA, D.; LAHIRI, V.; KLIONSKY, D.J. Cargo recognition and degradation by selective autophagy. **Nature Cell Biology**, v. 20, n. 3, p. 233–242, 2018.

GIVNISH, T. J.; BARFUSS, M. H.; VANEE, B.; RIINA, R.; SCHULTE, K.; HORRES, R.; GONSISKA, P. A.; JABAILY, R. S.; CRAYN, D. M.; SMITH, J. 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. 872-895, 2011.

GONZÁLEZ-ARNAO, M. T.; ENGELMANN, F. **Criocconservación de plantas en América Latina y el Caribe**. San José: IICA, 2013, 204 p.
GOUDA, E.J., BUTCHER, D. & GOUDA, K. (2018) [continuously updated] Encyclopaedia of Bromeliads. Version 3.2. Available from: <http://encyclopedia.florapix.nl/> (accessed January 2018).

HANDA, A. K.; FATIMA, T.; MATTOO, A. K. Polyamines: Bio-molecules with diverse functions in plant and human health and disease. **Frontiers in Chemistry**, v. 6, p. 10, 2018.

HERINGER, A.S.; STEINMACHER, D.A.; SCHMIDT, E.C.; BOUZON, Z.L.; GUERRA, M.P. Survival and ultrastructural features of peach palm (*Bactris gasipaes*, Kunth) somatic embryos submitted to cryopreservation through vitrification. **Protoplasma**, v. 250, n. 5, p. 1185–1193, 2013a.

HMELJEVSKI, K.V.; FREITAS, L.; DOMINGUES, R.; PEREIRA, A.R., CANCIO, A.S.; ANDRADE, A.C.; MACHADO, M.A.; VICCINIC, L.F.; FORZZA, R.C. Conservation assessment of an extremely restricted bromeliad highlights the need for population-based conservation on granitic inselbergs of the Brazilian Atlantic Forest. **Flora – Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, v. 209, n. 5, p. 250-259, 2014.

HOR, Y. L.; KIM, Y. J.; UGAP, A.; CHABRILLANGE, N.; SINNIAH, U. R.; ENGELMANN, F.; DUSSERT, S. Optimal hydration status for cryopreservation of intermediate oily seeds: Citrus as a case study. **Annals of botany**, v. 95, n. 7, p. 1153-1161, 2005.

HUGHES, B. A.; KANE, M. E. Seed cryopreservation of selected Florida native orchid species. **Seed Science and Technology**, v. 46, n. 3, p. 431-446, 2018.

HUSSAIN, S.S.; ALI, M.; AHMAD, M.; SIDDIQUE, K.H.M. Polyamines: natural and engineered abiotic and biotic stress tolerance in plants. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 3, p. 300–311, 2011.

LI, Y.; HE, J. Advance in metabolism and response to stress of polyamines in plant. **Acta Agric. Boreali Sinica**, v. 27, p. 240–245, 2012.

LIU, J.; PHY, J.; YEOMANS, E. Theoretic considerations regarding slow cooling and vitrification during cryopreservation. **Theriogenology**, v. 78, n.8, p. 1641-1652, 2012.

LIU, J.H.; WANG, W.; WU, H.; GONG, X.; MORIGUCHI, T. Polyamines function in stress tolerance: from synthesis to regulation. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 827, 2015.

MARTINELLI, G.; VIEIRA, C. M.; GONZALEZ, M.; LEITMAN, P.; PIRATININGA, A.; FERREIRA DA COSTA, A.; FORZZA, R.C. Bromeliaceae da mata atlântica brasileira: lista de espécies, distribuição e conservação. **Rodriguésia**, v.59, n.1, p.209-258, 2008.

MINOCHA, R.; MAJUMDAR, R.; MINOCHA, S.C. Polyamines and abiotic stress in plants: a complex relationship. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, n. 175, 2014.

MOREL, G.M.; WETMORE, R.H. Tissue culture of monocotyledons. **American Journal of Botany**, v. 38, n. 2, p. 138-140, 1951.

MOSCHOU, P.N.; ROUBELAKIS-ANGELAKIS, K.A. Polyamines and programmed cell death. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, p. 1285–1296, 2014.

MOSCHOU, P.N.; ROUBELAKIS-ANGELAKIS, K.A. Polyamines and programmed cell death. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, p. 1285–1296, 2014.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.

MUSTAFAVI, S.H.; BADI, H.N.; SEKARA, A.; AL, E. Polyamines and their possible mechanisms involved in plant physiological processes and elicitation of secondary metabolites. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 40, n. 102, 2018.

MUSTAFAVI, S.H.; BADI, H.N.; SEKARA, A.; AL, E. Polyamines and their possible mechanisms involved in plant physiological processes and elicitation of secondary metabolites. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 40, n. 102, 2018.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; FONSECA, G. A. B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p. 853-858, 2000.

O'BRIEN, T. P.; Feder, N. McCully, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. **Protoplasma**, v. 59, n. 2, p. 368-373, 1965.

PÁL, M.; SZALAI, G.; JANDA, T. Speculation: polyamines are important in abiotic stress signaling. **Plant Science**, v. 237, p. 16–23, 2015.

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 & Technology**, v. 38, n. 1, p. 79-87, 2010.

PIERUZZI, F. P.; DIAS, L. L.; BALBUENA, T. S.; SANTA-CATARINA, C.; DOS SANTOS, A. L.; FLOH, E. I. Polyamines, IAA and ABA during germination in two recalcitrant seeds: *Araucaria angustifolia* (Gymnosperm) and *Ocotea odorifera* (Angiosperm). **Annals of botany**, v. 108, n. 2, p. 337-345, 2011.

PRITCHARD, H.W. Classification of seed storage types for ex situ conservation in relation to temperature and moisture. In: GUERRANT,

E.O.; KAYRI, H.; MIKE, M. (eds.). **Ex situ plant conservation**. London: Island Press, 2004, p. 139–161.

PRITCHARD, H.W. Cryopreservation of Desiccation-Tolerant Seeds. In: DAY, J.G.; STACEY, G.N. (eds.). **Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols. Methods in Molecular Biology**, Humana Press, 2007.

PRITCHARD, H.W.; NADARAJAN, J. Cryopreservation of Orthodox (Desiccation Tolerant) Seeds. In: REED B.M. (ed.). **Plant Cryopreservation: A Practical Guide**. New York: Springer, 2008. p. 485-501.

RAMON, M.; GEUNS, J.M.C.; SWENNEN, R.; PANIS, B. Polyamines and fatty acids in sucrose precultured banana meristems and correlation with survival rate after cryopreservation. **Cryo Letters**, v. 23, n. 6, p. 345–352, 2002.

RODRIGUES, A.R.P.; FORZZA, R.C.; ANDRADE, A.C.S. 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, n. 4, p. 567-578, 2014.

SANDERS, P.M.; BUI, A.Q.; WETERINGS, K.; MCINTIRE, K.N.; HSU, Y.C.; LEE, P.Y.; TRUONG, M.T.; BEALS, T.P.; GOLDBERG, R.B. Anther developmental defects in *Arabidopsis thaliana* male-sterile mutants. **Sexual Plant Reproduction**, v. 11, p. 297-322, 1999. doi: 10.1007/s004970050.

SANTOS, I. R. I.; SALOMAO, A. N.; JOSE, S. C. B. R.; MUNDIM, R. C. **Cr terios para a avalia o de germoplasma vegetal após congelamento em nitrogênio líquido**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2015. 5 p.

SARAGUSTY, J.; GACITUA, H.; ROZENBOIM, I.; ARAV, A. Do physical forces contribute to cryodamage? **Biotechnology and Bioengineering**, v. 104, n. 4, p. 719–728, 2009.

SERSHEN; BERJAK, P.; PAMMENTER, N.W.; WESLEY-SMITH, J. Rate of dehydration, state of sub-cellular organization and nature of

cryoprotection are critical factors contributing to the variable success of cryopreservation: studies on recalcitrant embryos of *Haemanthus montanus*. **Protoplasma**, v. 249, n. 1, p. 171–186, 2012b.

SERSHEN; BERJAK, P.; PAMMENTER, N.W.; WESLEY-SMITH, J. The effects of various parameters during processing for cryopreservation on the ultrastructure and viability of recalcitrant zygotic embryos of *Amaryllis belladonna*. **Protoplasma**, v. 249, n. 1, p. 155–169, 2012a.

SHI, H.; CHAN, Z. Improvement of plant abiotic stress tolerance through modulation of the polyamine pathway. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 56, n. 2, p. 114–121, 2014.

SHI, H.; YE, T.; CHEN, F.; CHENG, Z.; WANG, Y.; YANG, P.; ZHANG, Y.; CHAN, Z. Manipulation of arginase expression modulates abiotic stress tolerance in *Arabidopsis*: effect on arginine metabolism and ROS accumulation. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, n. 5, p. 1367–1379, 2013.

SILVEIRA, V.; FLOH, E.I.S.; HANDRO, W.; GUERRA, M.P. Effect of plant growth regulators on the cellular growth and levels of intracellular protein, starch and polyamines in embryogenic suspension cultures of *Pinus taeda*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 76, n. 1, p. 53–60, 2004.

STANWOOD, P. C. Cryopreservation of seed germplasm for genetic conservation. In: KARTHA, K. K. **Cryopreservation of plant cells and organs**. Boca Rotan: CRC Press, 1985, p. 199–225.

STEHMANN, J.R.; FORZZA, R.C.; SOBRAL, M.; SALINO, A.; KAMINO, L.H.Y. **Plantas da Floresta Atlântica**. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2009, 516 p.

STEPONKUS, P.L.; UEMURA, M.; WEBB, M.S. The contrast of the cryostability of the plasma membrane of winter rye and spring oat – two species that widely differ in their freezing tolerance and plasma membrane lipid composition. In: STEPONKUS, P.L. (ed.). **Advances in low temperature biology**, vol. 2, London: JAI Press, 1993, p. 211–312.

TARRÉ, E.; MENDES, B.B.; GUIMARÃES, A.P.; 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.

VAN DOORN, W.G.; BEERS, E.P.; DANGL, J.L.; FRANKLIN-TONG, V.E.; GALLOIS, P.; HARA-NISHIMURA, I.; JONES, A.M.; KAWAI-YAMADA, M.; LAM, E.; MUNDY, J.; MUR, L.A.J.; PETERSEN, M.; SMERTENKO, A.; TALIANSKY, M.; VAN BREUSEGEM, F.; WOLPERT, T.; WOLTERING, E.; ZHIVOTOVSKY, B.; BOZHKO, P.V. Morphological classification of plant cell deaths. **Cell Death and Differentiation**, v. 18, n. 8, p. 1241–1246, 2011.

VOLK, G.M.; CASPERSEN, A.M. Plasmolysis and recovery of different cell types in cryoprotected shoot tips of *Mentha × piperita*. **Protoplasma**, v. 231, n. 3, p. 215–226, 2007.

VUOSKU, J.; KARPPINEN, K.; MUILU-MÄKELÄ, R.; KUSANO, T.; SAGOR, G. H. M.; AVIA, K. Scots pine aminopropyl transferases shed new light on evolution of the polyamine biosynthesis pathway in seed plants. **Annals of Botany**, v. 121, n. 6, p. 1243–1256, 2018.

WESLEY-SMITH, J.; BERJAK, P.; PAMMENTER, N.W.; WALTERS, C. Intracellular ice and cell survival in cryo-exposed embryonic axes of *Acer saccharinum*: an ultrastructural study of factors affecting cell and ice structures. **Annals of Botany**, v. 113, n. 4, p. 695–709, 2014.

WESLEY-SMITH, J.; PAMMENTER, N.W.; WALTERS, C.; BERJAK, P. The effects of two drying rates on the desiccation tolerance of embryonic axes of recalcitrant jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lamk.) seeds. **Annals of Botany**, v. 88, n. 4, p. 653–664, 2001a.

WESLEY-SMITH, J.; WALTERS, C.; PAMMENTER, N.W.; BERJAK, P. Interactions among water content, rapid (non-equilibrium) cooling to –196°C and survival of embryonic axes of *Aesculus hippocastanum* L. seeds. **Cryobiology**, v. 42, n. 3, p. 196–206, 2001b.

WESLEY-SMITH, J.; WALTERS, C.; PAMMENTER, N.W.; BERJAK, P. Why is intracellular ice lethal? A microscopical study showing evidence of programmed cell death in cryo-exposed embryonic axes of

recalcitrant seeds of *Acer saccharinum*. **Annals of botany**, v. 115, n. 6, p. 991-1000, 2015.

WYSE, S.V.; DICKIE, J.B.; WILLIS, K.J. Seed banking not an option for many threatened plants. **Nature Plants**, v. 4, p. 848–850, 2018.

XU, C.; WU, X.; ZHANG, H. Impact of D-Arg on drought resistance and endogenous polyamines in mycorrhizal *Pinus massoniana*. **J. Nanjing Forestry University**, v. 33, p. 19–23, 2009.

XU, L.; XING S.T.; SUN, X. Effects of polyamines on hormones contents and the relationship with the flower bud differentiation in chrysanthemum. **Plant Physiology Journal**, v. 50, n. 8, p. 1195–1202, 2014.

3 CAPÍTULO II. CRIOPRESERVAÇÃO DE CULTURAS NODULARES DE *Vriesea reitzii* POR VITRIFICAÇÃO: CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS E ULTRAESTRUTURAIS

RESUMO

A criopreservação garante a conservação de espécies ameaçadas que apresentam potencial econômico. No presente estudo estabeleceu-se um protocolo de criopreservação por vitrificação para culturas nodulares (CNs) de *Vriesea reitzii* Leme e Costa, bromélia endêmica da Mata Atlântica. CNs foram desidratadas por 0, 15, 30, 60 e 90 min. em solução de vitrificação (PVS2) e armazenadas em NL. Características morfoanatômicas e ultraestruturais foram analisadas ao longo das etapas criogênicas. CNs desidratadas por 15 e 30 min. apresentaram as maiores taxas de recuperação, 80,0 e 88,7%, respectivamente. Por outro lado, CNs desidratadas por 90 min. apresentaram apenas 40,8% de recuperação. CNs expostas por 15 min. em PVS2 e recuperadas em meio de cultura MS suplementado com ANA (2 μ M) e BAP (4 μ M) regeneraram microbrotos após a criopreservação. Através de análises histológicas e ultraestruturais alterações celulares foram observadas nos dois tratamentos de PVS2 avaliados (15 e 90 min.). No entanto, a exposição das CNs por 15 min. apresentou menor fitotoxidez, refletindo em maior sobrevivência, a qual sugeriu-se estar associada com o maior conteúdo de lipídios e mitocôndrias, bem como grãos de amido e plastoglóbulos nos plastídios. Este protocolo mostrou-se viável para a criopreservação de CNs de *V. reitzii*.

Palavras-chave: Bromeliaceae. Criogenia. Microbrotos. Morfoanatomia. Plastoglóbulos. PVS2.

ABSTRACT

Cryopreservation ensure the conservation of threatened species that have economic potential. In the present study established a cryopreservation protocol by vitrification for nodular cultures (NCs) of *Vriesea reitzii* Leme and Costa, bromeliad endemic to the Atlantic Forest. NCs were dehydrated for 0, 15, 30, 60 and 90 min. in plant vitrification solution (PVS2) and stored in liquid nitrogen (LN). Morpho-anatomical and ultrastructural features were analyzed along the cryogenic stages. NCs dehydrated for 15 and 30 min. presented the highest recovery rates, 80.0 and 88.7%, respectively. On the other hand, NCs dehydrated for 90 min. presented only 40.8% recovery. Cryopreserved NCs exposed for 15 min. in PVS2 were able to regenerate microshoots after cultivation in MS culture medium supplemented with 2 μ M of ANA and 4 μ M of BAP. Histological and ultrastructural analyzes revealed cellular alterations in the two PVS2 treatments evaluated (15 and 90 min). However, the NCs exposure for 15 min. was less phytotoxicity, reflecting in higher survival, which is suggested to be associated with higher content of lipids and mitochondria, as well as starch grains and plastoglobuli in plastids. This protocol proved to be viable for the cryopreservation of NCs of *V. reitzii*.

Keywords: Bromeliaceae. Cryogenic. Microshoots. Morphoanatomy. Plastoglobuli. PVS2.

3.1 INTRODUÇÃO

A família Bromeliaceae é um importante componente do bioma Mata Atlântica (MARTINELLI et al., 2008; GIVNISH et al., 2011). Estas espécies contribuem de forma significativa para a manutenção dos ecossistemas onde habitam, pois formam verdadeiros micro-habitats, por meio dos quais são estabelecidas interações com diversas espécies (BENZING, 2000; MARTINELLI, 2000; DÉZERALD et al., 2018).

Esta família possui 3584 espécies divididas em 75 gêneros. No Brasil, *Vriesea* Lindley compreende 226 espécies (GOUDA et al. [cont. atualizado]), sendo o quinto gênero mais diverso de angiospermas da Mata Atlântica (STEHMANN et al., 2009). *V. reitzii* Leme e Costa é uma bromélia epífita. Ocorre no sul do Brasil, nos domínios da Floresta Ombrófila Mista (Mata de Araucária). Distribui-se em altitudes que variam entre 750 e 1,200 m (LEME e COSTA, 1991). A espécie é vulnerável pois *Araucaria angustifolia*, seu habitat primário, teve suas populações naturais extremamente reduzidas (KLEIN, 1990; LEME e COSTA, 1991).

Além da inquestionável importância ecológica, as bromélias destacam-se na floricultura, especialmente pela sua aparência exótica, exuberância, diversidade de cores, longevidade pós-colheita e alta aceitação no mercado mundial (SOUZA et al. 2009; NEGRELLE et al. 2012). Genótipos com elevado potencial ornamental podem ser utilizados em programas de melhoramento genético para a geração de novos híbridos e clones (SOUZA et al. 2009). Neste sentido, o aprimoramento de tecnologias de armazenamento de clones obtidos a partir de genótipos elite, linhagens celulares com atributos especiais ou derivadas de espécies ameaçadas garante o melhoramento genético e apoia pesquisas inovadoras, além de preservar a diversidade genética das espécies.

A criopreservação consiste no armazenamento de materiais em temperaturas ultrabaixas, geralmente em NL (-196°C). Nestas condições os processos metabólicos e de divisão celular são reduzidos e isso permite uma conservação a longo prazo. Além disso, os materiais são armazenados em pequenos espaços, necessitando de pouca manutenção. Atualmente, a criopreservação é considerada o único método seguro e econômico de conservação por longo período de tempo. (ENGELMANN e DUSSERT, 2013).

Existem inúmeras técnicas de criopreservação, baseadas no princípio da vitrificação, definida como a transição da água diretamente da fase líquida para uma fase vítrea, não havendo formação de cristais de gelo (FAHY et al., 1984). Para atingir este estado vítreo, são utilizadas

soluções crioprotetoras concentradas (PVS2 e PVS3 são as mais comuns), as quais proporcionam aumento da viscosidade celular, desidratação celular adequada e supressão da formação de gelo (VOLK e WALTERS, 2010). No entanto, o tipo de solução, bem como o tempo de exposição precisa ser ajustado para cada espécie e explante a fim de proporcionar a desidratação adequada, sem danificar as células. Danos celulares causados pelas soluções de vitrificação ou geradas ao longo das etapas do protocolo de criopreservação podem ser observados através de análises microscópicas, as quais têm sido grandes aliadas da criobiologia (SERSHEN et al., 2012; WESLEY-SMITH et al., 2015; ZHANG et al., 2015; 2017; HALMAGYI et al., 2017).

As CNs são definidas com uma terceira via de morfogênese vegetal *in vitro*, pois apresentam características distintas da organogênese e da embriogênese somática (GEORGE, 1993). Esta via tem sido descrita em diversas bromélias, sendo muito estudada em *V. reitzii* (ALVES et al. 2006; GUERRA e DAL VESCO 2010; DAL VESCO et al. 2011; SCHERER et al. 2013). CNs são caracterizadas como aglomerados de nódulos organogênicos verde-amarelados a translúcidos com textura friável ou levemente compacta (DAL VESCO e GUERRA 2010; DAL VESCO et al. 2011; CORREDOR-PRADO et al., 2018), as quais se destacam pelo elevado potencial de regeneração de microbrotos (GUERRA e DAL VESCO, 2010; DAL VESCO et al., 2014a, 2014b). Devido a esta elevada capacidade regenerativa, as CNs são fortes candidatas para atuarem nos processos de criopreservação.

Assim, os principais objetivos deste trabalho foram: (1) desenvolver um protocolo para a criopreservação de CNs de *V. reitzii* através da técnica de vitrificação; (2) testar o efeito de diferentes tempos de desidratação em PVS2; (3) avaliar a capacidade das CNs em regenerar microbrotos após a criopreservação; e (4) analisar as características histológicas e ultraestruturais das CNs ao longo das etapas do protocolo, considerando os tempos de desidratação em PVS2 que proporcionarem a maior e a menor taxa de recuperação.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Indução de CNs

A indução das CNs foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Dal Vesco et al. (2014a). Cápsulas de *V. reitzii* foram coletadas na maturidade fisiológica, em abril de 2018, a partir de plantas mantidas em Curitiba, altitude 990 m no estado de Santa Catarina,

Brasil 27°16'58"S-50°35'04"W. As cápsulas foram desinfestadas sob agitação com etanol 70% por 10 min, seguido por solução de hipoclorito de sódio a 2% e Tween® 20 por 40 min, seguido por três enxagues em água destilada esterilizada em autoclave. Após a desinfestação, as cápsulas foram abertas em câmara de fluxo laminar estéril para a extração das sementes e a remoção dos apêndices plumosos. Em seguida, realizou-se a inoculação das sementes em frascos de vidro contendo 25 mL de meio de cultura gelificado com Phytigel® (2,0 g L⁻¹), composto pela formulação salina MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) e suplementado com vitaminas Morel (MOREL e WETMORE, 1951), sacarose (30 g L⁻¹) e Ácido Naftaleno Acético (ANA) (4 µM). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 1,3 atm durante 15 min., a 121 °C. As CNs foram subcultivadas a cada 20 dias neste meio de cultura e mantidas em sala de crescimento a 25 ± 2 °C com fotoperíodo de 16h e intensidade de luz de 50-60 µmol m⁻² s⁻¹, até a implementação do experimento de vitrificação.

3.2.2 Criopreservação

CNs (15 mg MF) foram criopreservadas por vitrificação conforme sumarizado na Fig. 1. Primeiro, as CNs foram pré-cultivadas em meio de cultura MS líquido suplementado com sacarose 0,3 M a 25 °C por 1 h. Após, este meio foi substituído pela solução *loading* (meio MS líquido + 2,0 M de glicerol + 0,4 M de sacarose) a 25 °C durante 20 min. Posteriormente, a solução *loading* foi substituída pela solução de vitrificação PVS2 (30% de glicerol, 15% de etilenoglicol, 15% DMSO e 0,4 M de sacarose diluídos em meio MS líquido) (SAKAI et al. 1990) a 25 °C por 0, 15, 30, 60 e 90 min. Após, as CNs foram inseridas em criotubos (2 mL) contendo 0,3 mL de PVS2, seguido de imersão em NL. Para cada tratamento (tempo em PVS2), um controle correspondente não submetido ao NL foi estabelecido. Após 24 h, os criotubos foram removidos do NL e descongelados em banho-maria a 40 °C durante 2 min. Em seguida, a solução PVS2 foi substituída pela solução *unloading* (meio MS líquido + sacarose 1,2 M) a 25 °C por 20 min., e esta solução foi substituída por meio de cultura MS líquido suplementado com sacarose 0,3 M a 25 °C por 60 min. Para a recuperação, as CNs foram transferidas para placas de Petri contendo 15 mL de meio de cultura MS gelificado (Phytigel® 2,0 g L⁻¹) e suplementado com ANA (4 µM). As placas foram mantidas em condições de escuro por 7 dias e por fim, transferidas para condições de luz. Nesta etapa, as CNs permaneceram em sala de crescimento com 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 16 h dia-1 e

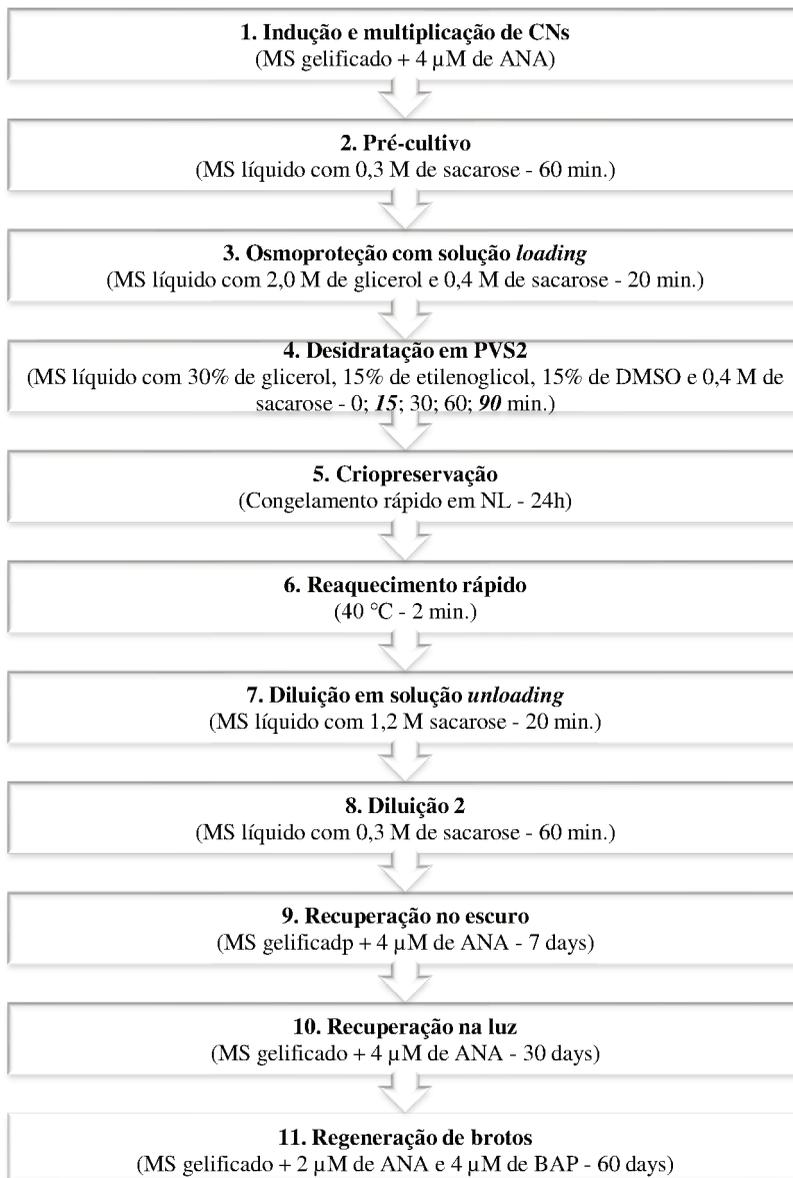
intensidade luminosa de 50-60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. O pH de todas as soluções descritas acima foi previamente corrigido para 5,8. Após 35 dias de cultivo *in vitro*, avaliou-se a recuperação através da contagem do número de CNs que apresentaram crescimento de novas células.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5 x 2, com dez tratamentos, sendo cinco tempos em PVS2 (0, 15, 30, 60, 90) e duas condições de armazenamento (com ou sem exposição ao NL) e quatro repetições. Cada unidade experimental consistiu em uma placa de Petri contendo seis aglomerados de culturas nodulares. Os dados foram submetidos à ANOVA ($P < 0,05$) e as médias separadas pelo teste Tukey ($P < 0,05$). Utilizou-se o programa Statistica® (Statsoft Inc., Tulsa, OK, EUA) para Windows® versão 7.0.

3.2.3 Regeneração de microbrotos após a criopreservação

CNs previamente desidratadas em PVS2 por 15 min. foram criopreservadas de acordo com a Fig. 1. Após a etapa de recuperação na luz, as CNs foram transferidas para meio de cultura MS suplementado com ANA (2 μM) e BAP (4 μM), conforme Dal Vesco et al. (2014b), visando avaliar a regeneração de microbrotos.

Figura 1 - Fluxograma do protocolo de vitrificação para culturas nodulares de *Vriesea reitzii*.



Fonte: PRADELLA (2019).

3.2.4 Análises anatômicas

Amostras de CNs desidratadas por 15 e 90 min. em PVS2 e criopreservadas de acordo com a Fig. 1 foram coletadas para análises morfoanatômicas e ultraestruturais nas seguintes etapas do protocolo de vitrificação desenvolvido: 1 (controle); 4; 5; 6; 10 (após 10 dias) e 10 (após 35 dias), conforme a Fig. 1.

3.2.4.1 Microscopia óptica (MO)

Amostras de CNs foram fixadas em glutaraldeído (2,5%) em tampão fosfato 0,2 M (pH 7,2) (1:1) por uma semana. Após a fixação, as amostras foram lavadas três vezes em tampão fosfato, por 30 min. (BOUZON, 2006), e desidratadas em série etílica gradual (SANDERS et al., 1999). Após a desidratação, as amostras foram pré-infiltradas em historesina (Leica® HistoResin, Heidelberg, Alemanha) e etanol PA (1:1) por uma semana e infiltradas com historesina por uma semana. Secções de 5 µm das CNs foram obtidas com micrótomo SLEE Technik®, distendido em lâminas com gota de água, e mantido a uma temperatura de $42 \pm 2^\circ \text{C}$. Após a evaporação da água, as secções foram submetidas à coloração com azul de toluidina (O'BRIEN et al., 1965). Aspectos relevantes foram identificados e capturados utilizando microscópio de fluorescência Leica DM5500 B.

3.2.4.1 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Amostras de CNs foram fixadas em solução de glutaraldeído 2,5% e sacarose 18 mM, tamponada com cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2) por uma semana. Em seguida, as amostras foram lavadas quatro vezes no mesmo tampão. A pós-fixação foi realizada com tetróxido de ósmio a 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2 (1:1), durante 6 h à temperatura ambiente (PUESCHEL, 1979). As amostras foram lavadas duas vezes em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2 (30 minutos cada) e desidratadas em uma série crescente de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e 100%), por 30 minutos em cada concentração, exceto a acetona 100%, com 2 trocas de 30 minutos cada (Adaptado de COIMBRA et al., 2004). Após a desidratação, as amostras foram infiltradas lentamente em resina Spurr (EMS Diasum, Hatfield, PA) e polimerizadas em moldes horizontais em estufa a 70 °C por 24 h (SPURR, 1969). Secções ultrafinas das CNs foram realizadas com ultramicrótomo (Leica, modelo EM UC 7) alocadas sobre grades de cobre e contratadas com acetato de uranila 5%

e citrato de chumbo (REYNOLDS, 1963). As imagens foram observadas e capturadas em microscópio eletrônico de transmissão JEM 1011 (JEOL Ltd., Tóquio, Japão, a 80 kV).

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Criopreservação e regeneração de microbrotos

A desidratação em PVS2 foi essencial para a recuperação das CNs após a exposição ao NL, bem como o tempo de exposição nesta solução, visto que ocorreu uma interação entre os tempos de exposição em PVS2 e o tratamento criogênico (Tabela 1). CNs não desidratadas, nem submetidas ao NL apresentaram 95,8% de recuperação (Tabela 1; Fig. a). Por outro lado, CNs não desidratadas em PVS2 apresentaram apenas 5% de recuperação após armazenamento em NL (Tabela 1; Fig. 2f). CNs desidratadas por 15 e 30 min. apresentaram as maiores taxas de recuperação após armazenamento em NL (88,0 e 88,7, respectivamente; Tabela 1; Figs. 2g, h, respectivamente), as quais não diferiram entre si, nem em relação as CNs não submetidas ao NL (Tabela 1; Figs. 2b, c). Por outro lado, a desidratação por 60 e 90 min. resultaram nas menores taxas de recuperação após armazenamento em NL (37,5 e 40,8%, respectivamente; Tabela 1; Figs. 2i, j, respectivamente), as quais não diferiram entre si, nem em relação as CNs não criopreservadas (Tabela 1; Figs 2d, e, respectivamente). Observou-se maior fitotoxicidade após desidratação por 90 min., visto que apenas 55% de recuperação foi obtida neste tempo (Tabela 1).

Durante a desidratação osmótica com soluções de vitrificação, as células podem sofrer danos por toxicidade química ou tensão excessiva, especialmente quando se utiliza a solução PVS2, composta por agentes como DMSO e glicerol, os quais penetram a membrana celular. Portanto, a otimização do tempo de exposição em PVS2 é a chave para encontrar um equilíbrio entre a desidratação celular apropriada e a toxicidade química (LAMBARDI et al., 2008), de modo que as células passem para o estado vítreo quando em contato com o NL, sem sofrer congelamento intracelular letal (FÁBIÁN et al., 2008; SAKAI et al., 2008). Souza et al. (2018b) testou diferentes tempos de exposição em PVS2 na criopreservação de meristemas apicais de genótipos cultivados e selvagens de abacaxi e verificou que o tempo dependia do genótipo utilizado. No entanto, de maneira geral 45 min. resultou na maior sobrevivência após a criopreservação. Não apenas o tempo de exposição em PVS2, mas o tamanho do explante, a condição fisiológica e a

aclimação ao estresse osmótico ou condições de frio são fatores importantes que influenciam no resultado de um protocolo.

A otimização de cada etapa pode gerar um grande impacto na recuperação celular e tecidual (REED, 2017). A etapa de pré-cultivo em 0.3 M de sacarose é crucial para induzir a tolerância dos materiais a etapa de desidratação em PVS2 e reduzir as lesões celulares que podem gerar morte dos tecidos (SOUZA et al., 2016). Esta solução aumenta a estabilidade das membranas, promove a desidratação intracelular e consequente aumento da pressão osmótica (SAKAI et al., 2008). O tempo nesta etapa varia nos diversos protocolos, sendo em geral de um ou dois dias. Neste protocolo inicial estabelecemos um tempo de 60 min. para o pré-cultivo e adicionamos uma segunda etapa de diluição (Fig. 1, etapa 8) após a *unloading*, onde utilizamos a mesma solução e tempo usados no pré-cultivo. Esta etapa, por sua vez, não é muito comum nos protocolos de vitrificação. Contudo, permite uma adaptação lenta as novas condições de cultivo, podendo contribuir com a sobrevivência das CNs. Além disso, adicionamos uma etapa de recuperação no escuro, na qual as CNs permaneceram por 7 dias. Esta etapa visa reduzir os efeitos foto-oxidativos potencialmente prejudiciais (WITHERS et al., 1988).

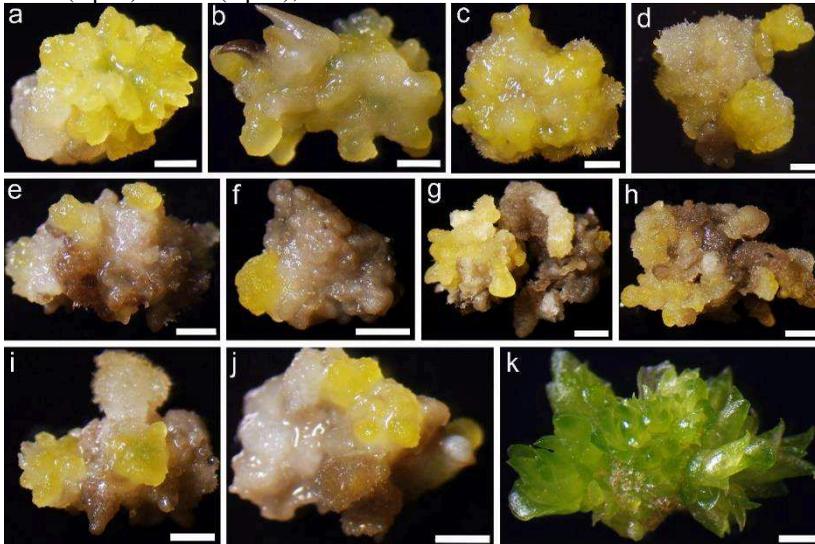
A recuperação completa de culturas celulares ou culturas multiplicadoras de brotações é a forma adequada para julgar o sucesso de um protocolo de criopreservação (REED, 2017). Neste trabalho, observou-se tanto o desenvolvimento de novas culturas, quanto a regeneração de microbrotos. Na Fig. 2k é possível visualizar a diferenciação de microbrotos 60 dias após o cultivo *in vitro* de CNs criopreservadas, as quais foram previamente desidratadas por 15 min. em PVS2.

Tabela 1 - Percentual de recuperação de culturas nodulares de *Vriesea reitzii* cultivadas *in vitro* por 35 dias após as seguintes condições: CNs tratadas com todas as soluções, exceto PVS2 no tempo 0, mas não armazenadas em nitrogênio líquido (-NL); CNs tratadas com todas as soluções, exceto PVS2 no tempo 0 e armazenadas em nitrogênio líquido (+NL)

Tempo em PVS2 (min.)	Recuperação (%)	
	-NL	+NL
0	95.8Aa	5.0Bb
15	79.2ABa	80.0Aa
30	75.0ABa	88.7Aa
60	59.2ABa	37.5Ba
90	55.0Ba	40.8Ba

Média de quatro repetições. Médias seguidas por letras diferentes, maiúsculas na coluna e minúsculas na linha diferem entre si pelo teste Tukey (5%). Fonte: PRADELLA (2019).

Figura 2 - CNs, 35 dias após o reaquecimento e microbrotos de *Vriesea reitzii* *in vitro*. **a** CNs não submetidas a PVS2; **b, c, d, e** CNs submetidas a PVS2 por 15, 30, 60 e 90 min., respectivamente; **f** CNs não submetidas a PVS2, mas submetidas ao nitrogênio líquido; **g, h, i, j** CNs submetidas a PVS2 por 15, 30, 60 e 90 min., respectivamente e submetidas ao nitrogênio líquido; **k** Microbrotos regenerados a partir de CNs desidratadas em PVS2 por 15 min. e criopreservadas em nitrogênio líquido 60 dias após o cultivo em MS gelificado e suplementado com ANA (2 μ M) e BAP (4 μ M); barras **a-k** = 1 mm



Fonte: PRADELLA (2019).

3.3.2 Respostas morfohistológicas e ultraestruturais de CNs em diferentes etapas da criopreservação

CNs de aspecto friável com nódulos organogênicos indiferenciados, coloração amarelada a translúcida e morfologia semelhante ao relatado por Dal Vesco e Guerra (2010) foram observadas na Fig. 3a.

Características de células com intensa atividade meristemática foram observadas através da MO de CNs não submetidas a desidratação em PVS2 ou ao NL (Fig. 3b). As células também apresentaram numerosos pequenos vacúolos, núcleos grandes e proeminentes, nucléolo evidente e elevada razão núcleo/citoplasma (Fig. 3b). Núcleo com nucléolo evidente e poucas regiões de heterocromatina foram observadas através das análises de MET (Fig. 3c). Células com muitas organelas, entre elas mitocôndrias e plastídios também foram observados (Fig. 3d).

Plastídios continham grãos de amido e plastoglóbulos (Fig. 3d). Características semelhantes também foram encontradas em meristemas apicais de kiwizeiro (MATHEW et al., 2018), embriões somáticos de *Bactris gasipaes* (HERINGER et al., 2013) e culturas embriogênicas de *Araucaria angustifolia* (FRAGA et al., 2016) não criopreservados.

As CNs desidratadas em PVS2 durante 15 min. apresentaram estrutura celular semelhante ao controle, com exceção de algumas células da região interna, as quais apresentaram aumento tênue na vacuolização (Fig. 3e). Observou-se uma pequena retração do citoplasma (Fig. 3f; cabeça de seta preta), indicando plasmólise e os vacúolos se dividiram em várias vesículas menores como consequência da perda de água. Zhang et al. (2014) observaram características similares em meristemas apicais de cravo. Observou-se também, células com elevado conteúdo lipídico (Fig. 3f). Após a desidratação em PVS2, verificou-se que o núcleo sofreu algumas alterações na forma e um leve aumento na proporção de heterocromatina foi verificado (Fig. 3f). Os plastídeos continham grãos de amido e um aparente aumento no conteúdo de plastoglóbulos nos plastídios foi notado (Fig. 3g).

Células de CNs desidratadas em PVS2 durante 90 min. revelaram dois comportamentos distintos. Células da região periférica estavam aparentemente mais íntegras (Fig. 3h), quando comparadas com células mais internas, as quais apresentaram maior vacuolização, bem como plasmólise (Fig. 3i). Conforme Volk e Caspersen (2007), células menores, com pequenos vacúolos e citoplasma de coloração densa apresentam menos plasmólise após a desidratação osmótica. Por outro lado, células grandes e vacuoladas exibem altos níveis de plasmólise quando tratadas com crioprotetores. No entanto, a plasmólise é um processo natural que ocorre quando as células são colocadas em soluções hipertônicas como é o caso das soluções de vitrificação. À medida que os vacúolos perdem água, a membrana plasmática recua da parede celular (BENSON, 2008). Isso também justifica por que células muito vacuolizadas podem morrer após desidratação excessiva.

Células sem plasmólise, com grande conteúdo de lipídios, apresentando fusão vacuolar, menor razão núcleo/citoplasma, bem como aumento na proporção de heterocromatina podem ser observadas em MET, após 90 min. de exposição em PVS2 (Fig. 3j). A fusão vacuolar, geralmente precedendo a autofagia (WESLEY-SMITH et al., 2001) e a autofagia são eventos relacionados com desidratação ou estresse osmótico (SERSHEN et al., 2012). Algumas células com plasmólise e plastídios contendo muitos plastoglóbulos também foram verificadas (Fig. 3k).

As CNs desidratadas em PVS2 por 15 min., seguido por

armazenamento em NL apresentaram células plasmolisadas, especialmente nas regiões centrais (Fig. 3l; cabeça de seta preta) e células estruturalmente preservadas nas regiões periféricas (Fig. 3l). Imagens de MET mostraram células com pouca ou nenhuma plasmólise, aumento expressivo no conteúdo de lipídios, plastídios com numerosos plastoglóbulos e vacúolos não visíveis (Fig. 3m). Rompimento de membranas, plasmólise e grande número de mitocôndrias também foram observados (Fig. 3n). Núcleos apresentaram deformações e aumento acentuado na proporção de heterocromatina (Fig. 3o). Alguns plastídios também continham grãos de amido (Fig. 3o).

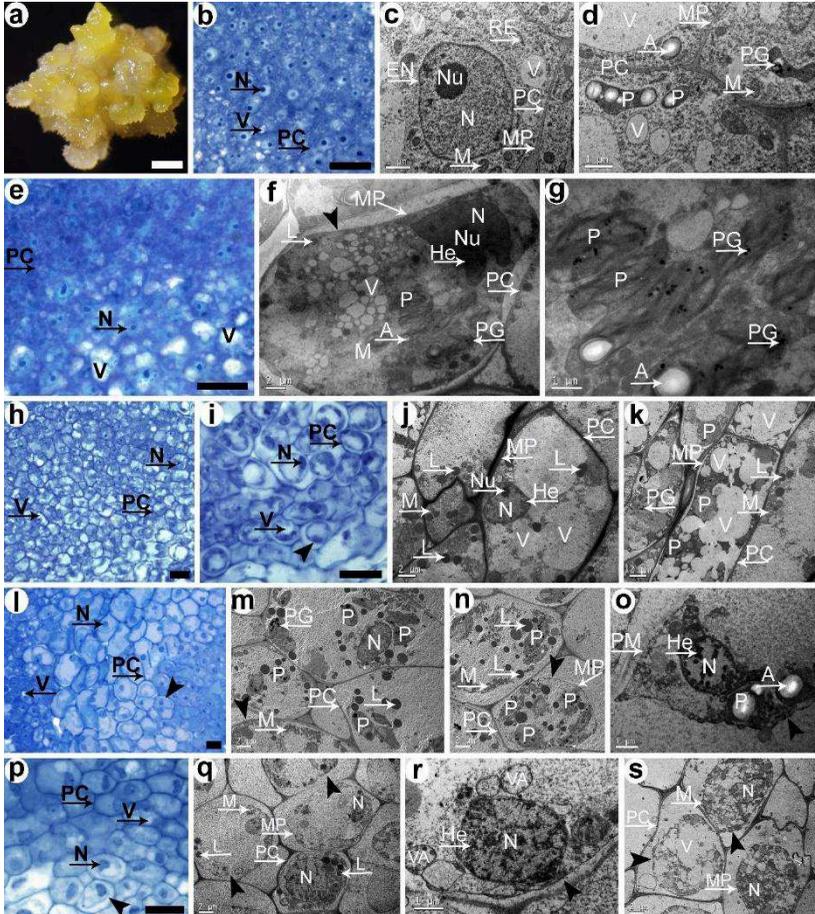
CNs desidratadas por 90 min. em PVS2, seguido por armazenamento em NL apresentaram menor número de células estruturalmente preservadas. Grande parte delas apresentou plasmólise (Fig. 3p). As imagens de MET confirmaram este relato. As células continham lipídios, porém em quantidade inferior em relação ao tratamento anterior, não sendo possível identificar a maioria das organelas (Fig. 3q). O núcleo apresentou elevada proporção de heterocromatina e o nucléolo não estava evidente (Fig. 3r). Observamos ainda, células com parede celular degradada, membrana celular rompida, elevado grau de vacuolização, fusão de vacúolos e presença de estruturas que lembram vesículas autofágicas descritas por Zhang et al. (2015), as quais sinalizam eventos de MCP (Figs. 3r, s).

O aumento no conteúdo de lipídios e a presença de grãos de amido nos plastídios, observado em células após a desidratação e a criopreservação indicam um metabolismo celular bastante ativo, os quais podem ter influenciado nas respostas à criopreservação (HERINGUER et al., 2013). Plastoglóbulos (PGs) são partículas lipoproteicas envolvidas por uma monocamada lipídica, presentes nos plastídios da maioria dos tecidos vegetais. Os lipídios dos plastoglóbulos presentes em plastídios consistem principalmente de prenilquinonas [em particular, plastoquinona-9 (PQ-9)] (BAILEY e WHYBORN, 1963; VAN WIJK e KESSLER, 2017). A PQ-9, por sua vez, atua na proteção dos lipídios dos tilacoides contra oxidação por espécies reativas de oxigênio (EROs) (KRUK et al., 2016). Sabemos que o estresse oxidativo induzido por EROS afeta seriamente a viabilidade das células vegetais durante a criopreservação (ZHANG et al., 2015). Assim, o aumento de PGs observado após a desidratação em PVS2 e após a criopreservação possivelmente esteja relacionado aos mecanismos de defesa celular contra danos gerados pelo estresse oxidativo nos plastídios.

Diversos estudos relatam um aumento na proporção de heterocromatina em relação a eucromatina em células submetidas a

processos criogênicos (WEN et al., 2012; HERINGER et al., 2013). Este evento pode ser observado desde a etapa de pré-cultivo (ZHANG et al., 2017). Alterações epigenéticas na cromatina, encontradas em plantas após a criopreservação sugerem modificações no padrão de expressão gênica. Em geral, regiões de eucromatina estão relacionadas com maior expressão gênica. No entanto, nestas regiões o DNA perde a associação com proteínas histonas, o que o torna vulnerável à digestão enzimática (HARDING, 2004). Neste sentido, o aumento da heterocromatina, observada especialmente após o armazenamento em NL pode ser um mecanismo de defesa das células para evitar a degradação do DNA.

Figura 3 - Microscopia óptica e microscopia eletrônica de transmissão de CNs de *Vriesea reitzii* não criopreservadas, após a desidratação em PVS2 e logo após o armazenamento em NL. CNs não submetidas à PVS2 ou ao NL. **a** CNs cultivadas em meio MS gelificado suplementado com ANA (4 μ M) (controle); **b** Células apresentando alta razão núcleo/citoplasma; **c** Célula com núcleo preservado e nucléolo evidente; **d** Células apresentando plastídios contendo grãos de amido e plastoglóbulos. CNs desidratadas em PVS2 durante 15 min. **e** Células com citoplasma denso; **f** Célula plasmolisada contendo muitos corpos lipídicos e núcleo com maior proporção de heterocromatina; **g** Plastídios contendo grãos de amido e muitos plastoglóbulos. CNs desidratadas em PVS2 durante 90 min. **h** Células preservadas; **i** Células plasmolisadas com maior vacuolização; **j** Células com grande conteúdo lipídico, fusão vacuolar e menor relação núcleo/citoplasma; **k** Células apresentando plastídios com muitos plastoglóbulos. CNs criopreservadas após desidratação em PVS2 por 15 min. **l** Células plasmolisadas na região central e células preservadas nas regiões periféricas; **m** Células não plasmolisadas, contendo muitos lipídios e plastídios ricos em plastoblóbulos; **n** Células plasmolisadas; **o** Núcleo com regiões de heterocromatina e plastídios contendo grãos de amido. CNs criopreservadas após desidratação em PVS2 por 90 min. **p** Células preservadas (região superior) e células plasmolisadas (região inferior); **q** Células apresentando menor conteúdo lipídico; **r** Núcleo apresentando elevada proporção de heterocromatina; **s** Células intensamente plasmolisadas e vacuolizadas; *N* núcleo; *PC* parede celular; *V* vacúolo; *M* mitocôndria; *P* plastídio; *MP* membrana plasmática; *RE* retículo endoplasmático; *Nu* nucléolo; *EN* envelope nuclear; *A* grãos de amido; *L* lipídios; *He* heterocromatina; *VA* vesículas autofágicas; *ponta de seta preta* plasmólise; *barra a* = 1 mm; *barra b, e, h, i, l, p* = 20 μ m; *barra c, d, g, o, r* = 1 μ m; *barra f, j, k, m, n, q, s* = 2 μ m



Fonte: PRADELLA (2019).

As CNs desidratadas em PVS2 por 15 min. apresentaram algumas células estruturalmente íntegras e outras apresentando grandes vacúolos plasmólise (Figs. 4a, b) após o rápido descongelamento. Nas imagens de MET, foi possível observar apenas células estruturalmente afetadas, apresentando membrana celular rompida, elevado conteúdo de mitocôndrias, lipídios e vacúolos e possivelmente presença de vesículas autofágicas (Fig. 4c). Núcleos com estrutura alterada, nucléolo evidente e muitas regiões de heterocromatina (Fig. 4d). Plastídios não foram identificados. O aumento no número de mitocôndrias sugere um aumento na atividade metabólica celular (SERSHEN et al., 2012).

CNs desidratadas em PVS2 durante 90 min. também apresentaram

algumas células não plasmolisadas (Fig. 4e). Contudo, outras células apresentaram intensa vacuolização e plasmólise (Fig. 4f). A partir das análises das imagens de MET, verificou-se claramente o vazamento do conteúdo celular, desintegração da parede celular, núcleo deformado, não sendo possível visualizar o nucléolo (Fig. 3g). Alguns plastídios foram observados, contudo, não apresentavam plastoglóbulos ou grãos de amido, sendo possível visualizar a membrana rompida em alguns deles (Fig. 3h).

Após 10 dias de recuperação na luz, CNs desidratadas com PVS2 por 15 min. e criopreservadas apresentavam regiões com células sobreviventes e com crescimento de novas células (Fig. 4i). Entretanto, observaram-se danos aparentemente tardios, os quais não haviam sido verificados nas etapas anteriores. Como pode-se observar, apenas algumas células da região periférica mantiveram a capacidade regenerativa (Fig. 4j). Não é possível afirmar em qual etapa estes danos foram intensificados, pois após o descongelamento, as CNs passaram por duas etapas de diluição e uma etapa de recuperação no escuro, nas quais não foram realizadas coletas para este estudo.

Imagens de MET apresentam células preservadas, possivelmente oriundas de regiões com crescimento de células novas. As mesmas características descritas nas CNs não criopreservadas foram observadas nestas células. Presença de muitas mitocôndrias e plastídios contendo plastoglóbulos e grãos de amido e aparentemente compostos fenólicos (Fig. 4k). Núcleo com nucléolo bastante evidente e poucas regiões de heterocromatina (Fig. 4l). Alguns lipídios, parede e membrana celulares íntegras e retículo endoplasmático (Fig. 4l).

Após 10 dias de recuperação na luz, CNs desidratadas com PVS2 por 90 min. não apresentaram qualquer sinal de regeneração celular (Fig. 4m). As células apresentaram intensa vacuolização, não sendo possível distinguir o núcleo (Fig. 4n). As imagens de MET apresentam células em elevado estágio de morte celular, restando apenas o núcleo em algumas células (Fig. 4o). Presença de estruturas não identificadas, podendo ser plastídios degradados também foram observadas (Fig. 4p).

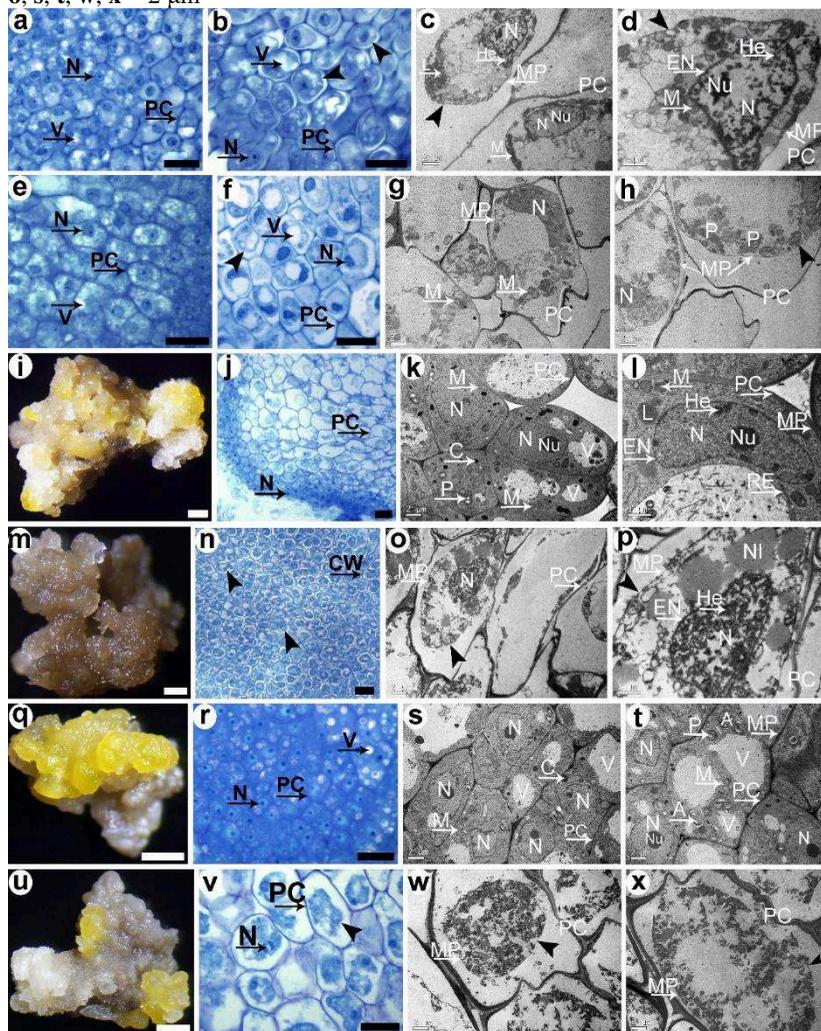
Após 35 dias de recuperação na luz, CNs tratadas com PVS2 por 15 min. e criopreservadas apresentaram maior multiplicação de CNs (Fig. 4q). As células apresentavam alta razão núcleo/citoplasma e características de células meristemáticas (Fig. 4r). Imagens de MET revelaram células com núcleos e nucléolos proeminentes, mitocôndrias, vacúolos menores na maioria das células e menor quantidade de compostos fenólicos em relação a etapa anterior (Fig. 4s). Plastídios contendo numerosos grãos de amido também foram observados (Fig. 4t).

A presença de plastídios contendo numerosos grãos de amido sugere a recuperação do metabolismo celular (HALMAGYI et al., 2017).

CNs tratadas com PVS2 por 90 min. e criopreservadas apresentaram algumas regiões com regeneração, as quais podem ser visualizadas na Fig. 4u. Porém, como a maioria das CNs não apresentou essa regeneração, as imagens na sequência representam as regiões necrosadas observadas em MO. Sendo assim, novamente são observadas células com intensa degradação e morte celular, onde os constituintes celulares não funcionais estão sendo autolisados pela própria célula (Figs 4.v, w, x).

Figura 4 - Microscopia óptica e microscopia eletrônica de transmissão de CNs de *Vriesea reitzii* após o descongelamento e após a recuperação in vitro. CNs desidratadas por 15 min. em PVS2, criopreservadas e descongeladas em banho-maria. **a** Células preservadas; **b** Células com plasmólise; **c** Vacuolização intensa e possível ocorrência de vesículas autofágicas; **d** Núcleo apresentando modificações estruturais e alta proporção de heterocromatina. CNs desidratadas por 90 min. em PVS2, criopreservadas e descongeladas em banho-maria. **e** Células preservadas; **f** Células plasmolisadas e intensamente vacuolizadas; **g** Célula apresentando rompimento da membrana plasmática; **h** Células apresentando desintegração da parede celular e plastídios sem plastoglóbulos e grãos de amido. CNs desidratadas por 15 min. em PVS2, criopreservadas, descongeladas em banho-maria, coletadas 10 dias após a recuperação na luz. **i** Aspecto morfológico das CNs; **j** Células regeneradas (região periférica); **k** Células regeneradas com presença de compostos polifenólicos e plastídios contendo grãos de amido e plastoglóbulos; **l** Células apresentando núcleo com poucas regiões de heterocromatina. CNs desidratadas por 90 min. em PVS2, criopreservadas, descongeladas em banho-maria, coletadas 10 dias após a recuperação na luz. **m** Aspecto morfológico das CNs; **n** Células plasmolisadas; **o** Células altamente degradadas apresentando parede celular desintegrada; **p** Células apresentando núcleo degenerado e estruturas não identificadas. CNs desidratadas por 15 min. em PVS2, criopreservadas, descongeladas em banho-maria e coletadas 35 dias após a recuperação na luz. **q** Aspecto morfológico das CNs; **r** Células com citoplasma denso e alta razão núcleo/citoplasma; **s** Células com menor conteúdo de compostos polifenólicos e núcleo contendo baixa proporção de heterocromatina; **t** Células apresentando muitos plastídios contendo grãos de amido. CNs desidratadas por 90 min. em PVS2, criopreservadas, descongeladas banho-maria e coletadas 35 dias após a recuperação na luz. **u** Aspecto morfológico das CNs; **v** Células altamente degradadas; **w** Células apresentando parede celular desintegrada e membrana plasmática rompida; **x** Célula em estágio avançado de morte celular; *N* núcleo; *PC* parede celular; *V* vacúolo; *M* mitocôndria; *P* plastídeo; *MP* membrana plasmática; *RE* retículo endoplasmático; *Nu* nucléolo; *EN* envelope nuclear; *A* grãos de amido; *L* lipídios; *He* heterocromatina; *VA* vesículas autofágicas; *C* compostos polifenólicos; *ponta*

de seta preta plasmólise; *NI* não identificado; barra q, u = 1 mm; barra a, b, e, f, j, n, r, v = 20 μ m; barra i, m = 500 μ m barra d, l, p = 1 μ m; barra c, g, h, k, o, s, t, w, x = 2 μ m



Fonte: PRADELLA (2019).

3.4 CONCLUSÃO

A principal contribuição deste trabalho diz respeito ao desenvolvimento do primeiro protocolo de criopreservação para CNs de bromélias, mais especificamente para a espécie *V. reitzii*. Este protocolo promoveu altas taxas de recuperação após o armazenamento em NL de CNs desidratadas em PVS2 por 15 e 30 min. (80,0 e 88,7%, respectivamente). A regeneração de microbrotos também confirmou a eficiência do protocolo. Análises histológicas e ultraestruturais revelaram que a desidratação por 15 min. em PVS2 foi adequada para proteger um número suficiente de células com estrutura celular altamente preservada após o tratamento criogênico. Por fim, a sobrevivência das células foi associada à maior quantidade de lipídios e mitocôndrias no citoplasma, bem como maior conteúdo de grãos de amido e plastoglóbulos nos plastídios.

REFERÊNCIAS

- ALVES, G.M.; DAL VESCO, L.L.; GUERRA, M.P. Micropropagation of the Brazilian endemic bromeliad *Vriesea reitzii* through nodule clusters culture. **Scientia Horticulturae**, v. 110, n. 2, p. 204–207, 2006.
- BAILEY, J.L.; WHYBORN, A.G. The osmophilic globules of chloroplasts. II. Globules of the spinach-beet chloroplast. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 78, n. 1, p. 163–74, 1963.
- BENSON, E.E. Cryopreservation theory. In: REED, B.M. (ed) **Plant cryopreservation: a practical guide**. Springer, New York, p. 15–32, 2008.
- BENZING, D.H. **Bromeliaceae: Profile of an Adaptive Radiation**. Cambridge University Press, New York. 2000.
- BOUZON, Z.L. Histoquímica e ultra-estrutura da ontogênese dos tetrasporângios de *Hypnea musciformis* (Wulfen) J. V. Lamour. (*Gigartinales, Rhodophyta*). **Revista brasileira de Botânica**, v. 29, p. 229-238, 2006. doi: 10.1590/S0100-84042006000200004.
- COIMBRA, S.; TORRÃO, L.; ABREU, I. Programmed cell death induces male sterility in *Actinidia deliciosa* female flowers. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 42, p. 537-541, 2004. doi: 10.1016/j.plaphy.2004.05.004.
- CORREDOR-PRADO, J.P.; DE CONTI, D.; ROECKER JÚNIOR, D.R.; CANGAHUALA-INOCENTE, G.C.; GUERRA, M.P.; DAL VESCO, L.L.; PESCADOR, R. Proteomic Identification of Differentially Altered Proteins During Regeneration from Nodular Cluster Cultures in *Vriesea reitzii* (Bromeliaceae). **Journal of Plant Growth Regulation**, p. 1-14, 2018.
- DAL VESCO, L. L.; GUERRA, M. P. In vitro morphogenesis and adventitious shoot mass regeneration of *Vriesea reitzii* from nodule cultures. **Scientia Horticulturae**, v. 125, n. 4, p. 748-755, 2010.
- DAL VESCO, L. L.; STEFENON, V. M.; WELTER, L. J.; SCHERER, R. F.; GUERRA, M. P. Induction and scale-up of *Bilbergia zebrina*

nodule cluster cultures: implications for mass propagation, improvement and conservation. **Scientia Horticulturae**, v. 128, n. 4, p. 515-522, 2011.

DAL VESCO, L. L.; VIEIRA, P. M.; CORREDOR-PRADO, J. P.; PESCADOR, R.; ELTER, L. J.; GUERRA, M. P. Induction and development of nodular cluster cultures in *Vriesea reitzii* (Leme and Costa), an endangered bromeliad from the Brazilian Atlantic Forest. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 89, n. 5, p. 542-548, 2014b.

DAL VESCO, L. L.; PESCADOR, R.; CORREDOR PRADO, J. P.; ELTER, L. J.; GUERRA, M.P. In vitro propagation of *Vriesea reitzii*, a native epiphyte bromeliad from the Atlantic rainforest. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 36, n. 3, p. 271-8, 2014a.

DÉZERALD, O.; LEROY, C.; CORBARA, B.; DEJEAN, A.; TALAGA, S.; CÉRÉGHINO, R. Tank bromeliads sustain high secondary production in neotropical forests. **Aquatic Sciences**, v. 80, n. 14, Jan. 2018.

ENGELMANN, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 47, n. 1, p. 5–16, 2011.

ENGELMANN, F.; DUSSERT, S. Cryopreservation. In: NORMAH, M.; CHIN, H.; REED, B. (eds). **Conservation of Tropical Plant Species**. Springer, New York, NY, 2013.

FÁBIÁN, A.; JAGER, K.; DARKÓ, É.; BARNABÁS, B. Cryopreservation of wheat (*Triticum aestivum* L.) egg cells by vitrification. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 30, n. 5, p. 737–744, 2008.

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.

FRAGA, H.; VIEIRA, L.; PUTTKAMMER, C.; DA SILVA, J.; DON ANJOS, K.; OLIVEIRA, E.; GUERRA, M. High-efficiency cryopreservation of *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze embryogenic cultures: ultrastructural characterization and morpho-physiological

features. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 124, n. 2, p. 307–318, 2016.

GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture: the technology**. Part 1, 2 ed. Exegetics: Edington, 1993. 574 p.

GIVNISH, T. J.; BARFUSS, M. H.; VANEE, B.; RIINA, R.; SCHULTE, K.; HORRES, R.; GONSISKA, P. A.; JABAILY, R. S.; CRAYN, D. M.; SMITH, J. 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. 872-895, 2011.

GOUDA, E.J., BUTCHER, D. & GOUDA, K. (2018) [continuously updated] Encyclopaedia of Bromeliads. Version 3.2. Available from: <http://encyclopedia.florapix.nl/> (accessed January 2018).

GUERRA, M. P.; DAL VESCO, L. L. Strategies for the Micropropagation of Bromeliads. In: JAIN, S. M.; OCHATT, S.J. (eds.) **Protocols for in vitro propagation of ornamental plants: Methods in Molecular Biology**. New York: Humana Press-Springer, v. 589, p. 47-66, 2010.

HALMAGYI, A.; COSTE, A.; TRIPON, S.; CRĂCIUN, C. Low temperature induced ultrastructural alterations in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) shoot apex cells. **Scientia Horticulturae**, v. 222, p. 22–31, 2017.

HARDING, K. Genetic integrity of cryopreserved plant cells: a review. **CryoLetters**, v. 25, n. 1, p. 3–22, 2004.

HERINGER, A.S.; STEINMACHER, D.A.; SCHMIDT, E.C.; BOUZON, Z.L.; GUERRA, M.P. Survival and ultrastructural features of peach palm (*Bactris gasipaes*, Kunth) somatic embryos submitted to cryopreservation through vitrification. **Protoplasma**, v. 250, n. 5, p. 1185–1193, 2013.

ISTA. 2005. International Seed Testing Association. International rules for seed testing. Bassersdorf: International Seed Testing Association.

KLEIN, R.M. **Espécies raras ou ameaçadas de extinção do estado de Santa Catarina**. Rio de Janeiro:IBGE - Diretoria de Geociências, 1990.

KRUK, J.; SZYMANSKA, R.; NOWICKA, B.; DLUZEWSKA, J. Function of isoprenoid quinones and chromanols during oxidative stress in plants. **New Biotechnology**, v. 33, n. 5, p. 636–643, 2016.

LAMBARDI, M.; OZUDOGRU, E.A.; BENELLI, C. Cryopreservation of embryogenic cultures. In: REED, B.M. (ed.). **Plant cryopreservation—a practical guide**. New York: Springer Science and Business Media, 2008, p. 177–210.

LEME, E.M.C.; COSTA, A. A new species from Southern Brazil, a tribute to Father Raulino Reitz. **Journal of the Bromeliad Society**. 41:195-198, 1991.

MARTINELLI, G. The Bromeliads of the Atlantic Forest. **Scientific American**, v. 282, n. 3, p. 86-93, 2000.

MARTINELLI, G.; VIEIRA, C. M.; GONZALEZ, M.; LEITMAN, P.; PIRATININGA, A.; FERREIRA DA COSTA, A.; FORZZA, R.C. Bromeliaceae da mata atlântica brasileira: lista de espécies, distribuição e conservação. **Rodriguésia**, v.59, n.1, p.209-258, 2008.

MATHEW, L.; MCLACHLAN, A.; JIBRAN, R.; BURRITT, D.J.; PATHIRANA, R. Cold, antioxidant and osmotic pre-treatments maintain the structural integrity of meristematic cells and improve plant regeneration in cryopreserved kiwifruit shoot tips. **Protoplasma**, v. 255, n. 4, p. 1065-1077, 2018.

MOREL, G.M.; WETMORE, R.H. Tissue culture of monocotyledons. **American Journal of Botany**, v. 38, n. 2, p. 138-140, 1951.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.

NEGRELLE, R.R.B.; MITCHELL, D.; ANACLETO, A. Bromeliad ornamental species: conservation issues and challenges related to commercialization. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 34, n. 1, p. 91-100, 2012.

NIINO, T.; SAKAI, A.; YAKUWA, H.; NOJIRI, K. Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of apple and pear by vitrification. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 28, n. 3, p. 261–266, 1992.

O'BRIEN, T. P.; Feder, N. McCully, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. **Protoplasma**, v. 59, n. 2, p. 368-373, 1965.

PUESCHEL, C. Ultrastructure of tetrasporogenesis in *Palmaria palmata* (Rhodophyta). **Journal of Phycology**, v. 15, p. 409-424, 1979.

REED, B.M. Plant cryopreservation: a continuing requirement for food and ecosystem security. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 53, n. 4, p. 285-288, 2017.

REYNOLDS, E.S. The use of lead citrate at light pH as an electron opaque stain in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, v. 17, p. 208-212, 1963.

SAKAI, A.; HIRAI, D.; NIINO, T. Development of PVS-based vitrification and encapsulation-vitrification protocols. In: REED, B.M. (ed.). **Plant cryopreservation: a practical guide**. New York: Springer, 2008, p. 33–51.

SAKAI, A.; KOBAYASHI, S.; OIYAMA, I. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. **Plant Cell Reports**, v. 9, n. 1, p. 30–33, 1990.

SANDERS, P.M.; BUI, A.Q.; WETERINGS, K.; MCINTIRE, K.N.; HSU, Y.C.; LEE, P.Y.; TRUONG, M.T.; BEALS, T.P.; GOLDBERG, R.B. Anther developmental defects in *Arabidopsis thaliana* male-sterile mutants. **Sexual Plant Reproduction**, v. 11, p. 297-322, 1999. doi: 10.1007/s004970050.

SCHERER, R. F.; GARCIA, A. C.; FRAGA, H. P. F.; DAL VESCO, L. L.; STEINMACHER, D.; GUERRA, M. P. Nodule cluster cultures and temporary immersion bioreactors as a high performance micropropagation strategy in pineapple (*Ananas cosmosus* var. *cosmosus*). **Scientia Horticulturae**, v. 151, p. 38-45, 2013.

SCHMIDT, É.C.; PEREIRA, B.; SANTOS, R.; PONTES, C.L.M.; SCHERNER, F.; HORTA, P.A.; PAULA, M.R.; LATINI, A.; RAMLOV, F.; MARASCHIN, M.; BOUZON, Z. L. Alterations in architecture and metabolism induced by ultraviolet radiation-B in the carragenophyte *Chondracanthus teedei* (Rhodophyta, Gigartinales). **Protoplasma**, v. 249, n. 2, p. 353-367, 2012.

SERSHEN; BERJAK, P.; PAMMENTER, N.W.; WESLEY-SMITH, J. The effects of various parameters during processing for cryopreservation on the ultrastructure and viability of recalcitrant zygotic embryos of *Amaryllis belladonna*. **Protoplasma**, v. 249, n. 1, p. 155–169, 2012.

SOUZA, E.H.; ROSA, S.S.; SOUZA, F.V.D.; MELO, V.C. Floral induction of *Neoregelia carolinae* (Beer) L. B. Sm and *Aechmea fasciata* (Lindley) Baker (Bromeliaceae). **Magistra**, v. 21, p. 305–310, 2009.

SOUZA, F. V. D.; KAYA, E.; DE, L.; SOUZA, E. H.; AMORIM, V. B. DE. O.; SKOGERBOE, D.; MATSUMOTO, T.; ALVES, A.; LEDO, C. A. DA. S.; JENDEREK, M. Droplet-vitrification and morphohistological studies of cryopreserved shoot tips of cultivated and wild pineapple genotypes. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 124, n. 2, p. 351-360, 2016.

SOUZA, F.V.D.; DE SOUZA, E.H.; KAYA, E.; DE JESUS VIEIRA, L.; DA SILVA, R.L. Cryopreservation of Pineapple Shoot Tips by the Droplet Vitrification Technique. **Methods in Molecular Biology**, v. 1815, p. 269-277, 2018b.

SPURR, A.R. A low viscosity epoxy resin-embedding medium for electron microscopy. **Journal of Ultrastructure Research**, v. 26, p. 31-43, 1969. doi: 10.1016/S0022-5320(69)90033-1.

STEHMANN, J.R.; FORZZA, R.C.; SOBRAL, M.; SALINO, A.; KAMINO, L.H.Y. **Plantas da Floresta Atlântica**. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2009, 516 p.

VAN WIJK, K.J.; KESSLER, F. Plastoglobuli: plastid microcompartments with integrated functions in metabolism, plastid developmental transitions, and environmental adaptation. **Annual Review of Plant Biology**, v. 68, p. 253–289, 2017.

VOLK, G.M.; CASPERSEN, A.M. Plasmolysis and recovery of different cell types in cryoprotected shoot tips of *Mentha × piperita*. **Protoplasma**, v. 231, n. 3, p. 215–226, 2007.

VOLK, G.M.; WALTERS, C. Preservation of genetic resources in the national plant germplasm clonal collections. In: JANICK, J. (ed.). **Plant Breeding Reviews**. Oxford: John Wiley & Sons, 2010, p. 291–344.

WEN, B.; CAI, C.; WANG, R.; SONG, S.; SONG, J. Cytological and physiological changes in recalcitrant Chinese fan palm (*Livistona chinensis*) embryos during cryopreservation. **Protoplasma**, v. 249, n. 2, p. 323–335, 2012.

WESLEY-SMITH, J.; WALTERS, C.; PAMMENTER, N.W.; BERJAK, P. Interactions among water content, rapid (non-equilibrium) cooling to -196°C and survival of embryonic axes of *Aesculus hippocastanum* L. seeds. **Cryobiology**, v. 42, n. 3, p. 196–206, 2001.

WESLEY-SMITH, J.; WALTERS, C.; PAMMENTER, N.W.; BERJAK, P. Why is intracellular ice lethal? A microscopical study showing evidence of programmed cell death in cryo-exposed embryonic axes of recalcitrant seeds of *Acer saccharinum*. **Annals of botany**, v. 115, n. 6, p. 991-1000, 2015.

WITHERS, L.A. Germplasm conservation. In: BLOCK, G.; MARCH, J. (ed.). **Applications of Plant Cell and Tissue Culture**. Chichester, UK: Wiley, 1988, p. 163–177.

ZHANG, D.; LIU, D.; LV, X.; WANG, Y.; XUN, Z.; LIU, Z.; LI, F.; LU, H. The Cysteine Protease CEP1, a Key Executor Involved in Tapetal Programmed Cell Death, Regulates Pollen Development in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, v. 26, n. 7, p. 2939–2961, 2014.

ZHANG, D.; REN, L.; CHEN, G. Q.; ZHANG, J.; REED, B. M.; SHEN, X. H. ROS-induced oxidative stress and apoptosis-like event directly affect the cell viability of cryopreserved embryogenic callus in *Agapanthus praecox*. **Plant Cell Reports**, v. 34, n. 9, p. 1499–1513, 2015.

ZHANG, J.M.; HAN L.; LU, X.X.; VOLK, G.M.; XIN, X.; YIN, G.K.; HE, J.J.; WANG, L.; CHEN, X.L. Cryopreservation of *Jerusalem*

artichoke cultivars using an improved droplet-vitrification method. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 128, n. 3, p. 577–587, 2017.

4 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Neste trabalho, sementes de duas espécies de bromélias foram criopreservadas dentro de suas cápsulas, garantindo taxas aceitáveis na formação de plântulas normais e eliminando a contaminação *in vitro*. Alterações estruturais celulares foram observadas em sementes com maior teor de umidade. Portanto, a dessecação das cápsulas é necessária antes de seu armazenamento em NL, principalmente se coletada não for realizada durante a maturidade de colheita. O incremento nas concentrações de PAs, especialmente Put, foi associado ao armazenamento criogênico.

O protocolo proposto para criopreservação de CNs de *V. reitzii* mostrou-se eficiente. CNs desidratadas em PVS2 durante 15 ou 30 min. apresentaram 80,0 e 88,7% de recuperação após a criopreservação, respectivamente. Além disso, estas culturas apresentaram potencial de regenerar microbrotos. A desidratação durante 15 min. em PVS2 protegeu um número suficiente de células, as quais apresentaram características estruturais preservadas e foram capazes de regenerar novas células. O aumento no conteúdo de corpos lipídicos e mitocôndrias, bem como a presença de grãos de amido e plastoblôbulos nos plastídios possivelmente influenciaram na sobrevivência das células criopreservadas.

Os mecanismos de ação das PAs durante as etapas de criopreservação ainda precisam ser elucidados, assim como o papel específico de cada uma delas. Estes compostos possivelmente atuam em conjunto com outras moléculas, como hormônios e EROs em resposta ao estresse desencadeado pelo congelamento. Outra direção de pesquisa diz respeito a aplicação exógena de PAs com a finalidade de promover taxas mais elevadas de sobrevivência após a criopreservação.

O protocolo de criopreservação proposto para CNs também pode ser aprimorado especialmente nas etapas de diluição em MS suplementado com 0,3M de sacarose (verificando-se a real necessidade desta etapa), no tempo de recuperação em condições de escuro, o qual pode ser reduzido. Além disso, a solução PVS3 poderia ser testada a fim de diminuir os custos do processo. Neste trabalho foram utilizadas CNs após vários subcultivos *in vitro*. Sendo assim, a criopreservação de CNs logo após a sua indução, pode gerar resultados ainda mais promissores. Por fim, informações a respeito da criopreservação de CNs originadas a partir de bases foliares ou outros tecidos ainda são insuficientes. Dados preliminares indicam que o sucesso está relacionado com o grau de diferenciação das células. Portanto, quanto maior a indiferenciação, maior o potencial de sucesso na criopreservação.