

Criopreservação de sementes de *Physalis angulata* L. por meio da desidratação em sílica gel

Cryopreservation of *Physalis angulata* L. seeds through dehydration on silica gel

Camila Vitória Nunes de Faria^{1*}, Renato Paiva¹, Rodrigo Therezan de Freitas¹,
Júnia Rafael Mendonça Figueiredo¹, Diogo Pedrosa Corrêa da Silva¹, Michele Valquíria dos Reis¹

RESUMO

A *Physalis angulata* L. é uma espécie nativa de regiões tropicais, sendo seus frutos utilizados na forma *in natura* na alimentação e na indústria farmacêutica. Visando este mercado a cultura *in vitro* é uma excelente alternativa para a conservação *ex situ* de espécies, que apresentam potencial econômico, sendo a criopreservação em nitrogênio líquido (NL) a técnica mais recomendada para esse fim. Objetivou-se criopreservar sementes de *P. angulata*, avaliando o efeito do tempo de desidratação em sílica gel na germinação *in vitro* após a retirada do NL. As sementes de *P. angulata* foram desidratadas em sílica gel por 0, 1, 5, 10, 30 e 60 minutos antes da imersão em NL. O teor de umidade (%) das sementes foi avaliado antes da desidratação em sílica gel. As sementes criopreservadas foram descongeladas em banho maria 40°C e inoculadas em meio de cultura MS. Após 30 dias, foram avaliadas a germinação, folhas formadas e o comprimento da parte aérea e da raiz principal (cm). Após 60 dias as plântulas originadas de sementes criopreservadas com 0, 30 e 60 min de desidratação foram aclimatizadas. Após 45 dias de aclimatização foram avaliados a sobrevivência, comprimento da parte aérea (cm), número de folhas e peso fresco (g) e seco da parte aérea (g). Houve 100% de germinação tanto para as sementes desidratadas, quanto para as sementes desidratadas e imersas em nitrogênio líquido. Todas as plântulas apresentaram aspecto normal. Apenas o comprimento da raiz principal, nos tempo 30 e 60 minutos, foram significativamente menores. Com relação à aclimatização, todas as plantas sobreviveram. Portanto, sementes de *Physalis angulata* L. podem ser criopreservadas sem a desidratação.

Palavras chave: Conservação *in vitro*, nitrogênio líquido, camapú.

ABSTRACT

Physalis angulata L. is native to tropical regions. Their fruits are used *in natura* and in the pharmaceutical industry. Aiming this market, *in vitro* culture is an excellent alternative to the *ex situ* conservation of species with economic potential, and cryopreservation in liquid nitrogen (LN), the most used technique. We aimed to cryopreserve *P. angulata* seeds, evaluating the dehydration time on silica gel, and its effect *in vitro* germination after removal of the LN. *P. angulata* seeds were dehydrated on silica gel for 0, 1, 5, 10, 30 and 60 minutes before immersion in LN. Moisture content (%) of seeds was evaluated. Cryopreserved seeds were defrosted in 40°C water bath and inoculated in MS medium. After 30 days, germination, formed leaves, shoot length and the main root length (cm) was evaluated. After 60 days, the cryopreserved seedlings obtained with 0, 30 and 60 min dehydration were acclimatized. After 45 days of acclimatization, survival, shoot length (cm), number of leaves, fresh weight (g) and dry aerial part (g) were evaluated. It was observed 100% germination for both dehydrated seeds as well seeds immersed in liquid nitrogen. Only the length of the main root in 30 and 60 minutes was significantly lower. Regarding acclimatization, all plants survived. *Physalis angulata* seeds can be cryopreserved without dehydration.

Keywords: *In vitro* conservation, liquid nitrogen, camapú.

INTRODUÇÃO

A família Solanaceae apresenta grande destaque entre as angiospermas, contendo cerca de 150 gêneros e mais de 3000 espécies, tendo como principal centro de diversidade e origem a América do Sul (Souza; Lorenzi, 2005). Essa família é importante, não só para alimentação humana, como também para fins ornamentais, além de ser bastante empregada na indústria farmacológica, por

apresentar compostos da classe dos alcaloides esteroides (Silva et al. 2005).

Dentro dessa família, o gênero *Physalis* apresenta cerca de 90 espécies amplamente distribuídas por todo o continente americano sendo que, no Brasil são encontradas oito espécies distribuídas principalmente na Amazônia e Nordeste (Stehmann et. al, 2015). Como principal característica medicinal, o grupo apresenta a produção de esteroides, denominados vitaesteróides que

Recebido em 19 de Janeiro de 2016 e aprovado em 10 de Junho de 2016

¹Universidade Federal de Lavras/UFLA, Departamento de Biologia/DBI, Lavras, MG, Brasil.

*Autor para correspondência: camila-vitoria@hotmail.com

possuem um grande interesse na indústria farmacêutica. Os vitaesteróides possuem várias substâncias na sua composição, sendo a mais importante a vitafisalina (Tomassini et al., 2000). Essa substância química opera no sistema imunológico humano e possui atividades anti-inflamatórias, antivirótica e antipirética, além disso, tem o poder de redução de índices glicêmicos e colesterol (Rufato et al., 2008). Dentre as espécies que produzem esse grupo de compostos, destaca-se a *Physalis angulata* L.

P. angulata L., é conhecida popularmente como camapú, juá-de-capote ou saco-de-bode e é nativa da região amazônica crescendo espontaneamente em todo o país (Moschetto, 2005). Sua distribuição é Neotropical ocorrendo na América do Norte, Central, do Sul e Caribe (Lorenzi; Matos, 2008).

No cenário econômico, é uma planta que tem despertado o interesse de consumidores e por consequência de produtores de médio e grande porte. Os frutos consumidos *in natura* são ricos em vitamina A e C, fibras, minerais, compostos fenólicos e antioxidantes. A espécie tem grande uso na medicina popular, suas propriedades são usadas para casos de Malária, Hepatite B e algumas infecções (Lorenzi; Matos, 2008).

A conservação de germoplasma de espécies nativas com alto potencial comercial, seja ele ornamental, para consumo ou farmacológico, como é o caso da *P. angulata*, é importante para preservar a variabilidade genética e permitir o estudo de suas propriedades em ambiente controlado e é suportado pelo método de cultura *in vitro* (Bertoni et al., 2010).

Dentre essas técnicas de cultivo *in vitro*, destaca-se a criopreservação, em que o material biológico vivo é armazenado em nitrogênio líquido (NL) a ultrabaixas temperaturas (-196 °C), resultando teoricamente, na paralisação do metabolismo celular (Meletti et al., 2007; Reed, 2008; Kaczmarczyk et al., 2011). Atualmente, a criopreservação é o método de conservação que melhor garante o armazenamento em longo prazo de germoplasma por possui vantagens em relação a outras metodologias, como a redução ou eliminação de danos causados no DNA, além do material ser armazenado em pequenos volumes e, teoricamente, por período de tempo ilimitado (Engelmann, 2011; Pence, 2011).

Diante do exposto, objetivou-se criopreservar sementes de *P. angulata* avaliando o efeito do tempo de desidratação pela exposição em sílica gel, na germinação *in vitro*.

MATERIA E MÉTODOS

Sementes de *P. angulata* L., obtidas a partir de frutos maduros, foram levadas a câmara de fluxo laminar para serem desinfestadas em álcool etílico 70% durante 30 segundos, e em hipoclorito de sódio (NaOCl) com 2% de cloro ativo durante 10 minutos. Posteriormente foram lavadas três vezes em água destilada e autoclavada.

Após a assepsia, as sementes foram desidratadas, em caixas Gerbox[®] (11x 11x 3cm), contendo 160g de sílica gel, por diferentes períodos de tempos (0, 1, 5, 10, 30 ou 60 minutos). A verificação do teor de água foi realizada posteriormente aos períodos de desidratação em sílica gel. Três repetições, com 30 sementes, foram utilizadas (em cada tempo) para a determinação do teor de água, e para isso utilizou-se o método padrão da estufa a 105 ± 3 °C, durante 24 h. Após cada período de desidratação as sementes foram imersas em NL (-196 °C) por 60 minutos. Posteriormente, as sementes foram descongeladas por 3 minutos em banho-maria, na temperatura de 38 ± 2 °C e então inoculadas em meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose e 2,5 g L⁻¹ de Phytigel[®] com pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem. Os controles (não criopreservados) foram inoculados diretamente sem passar pelo congelamento e descongelamento.

As sementes criopreservadas (+NL) e seus respectivos controles (-NL), foram mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 25 ± 2 °C, com irradiância de fótons de 36 μmol m⁻²s⁻¹, por 30 dias.

As avaliações foram realizadas após 30 dias e foram avaliadas a porcentagem de sementes germinadas (%G) e porcentagem de plântulas normais (%N). As sementes foram consideradas germinadas quando apresentaram radícula protundida com no mínimo de 2mm e as plântulas consideradas normais quando apresentaram formação de radícula e parte aérea. Também foram avaliados o número de folhas formadas e o comprimento da parte aérea e da raiz principal (cm).

Após 60 dias, as plântulas formadas oriundas de sementes criopreservadas foram transferidas para tubetes de polipropileno com substrato comercial Tropstrato® 50% + Vermiculita 50% e mantidas em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 25 ± 2 °C, com irradiância de fótons de $36 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Foram utilizados o menor (0 minutos) e os dois maiores (30 e 60 minutos) tempos de desidratação para comparar o efeito da mesma no desenvolvimento das plântulas quando aclimatizadas. Os tubetes permaneceram cobertos com envoltório plástico nos primeiros 30 dias para a manutenção da umidade, e após 45 dias de aclimatização foram avaliados a sobrevivência, comprimento da parte aérea (cm), número de folhas e peso fresco (g) e seco da parte aérea (g).

O experimento de criopreservação foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com três repetições de 10 sementes cada. Para a aclimatização, foram utilizadas 15 repetições por tratamento, sendo cada parcela composta por uma planta. Os dados obtidos foram analisados comparando-se as médias pelo teste de Scott-knot a 5% de probabilidade pelo software estatístico Sisvar® (Ferreira, 2013).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O conteúdo de água inicial da semente de *P. angulata* foi de 7,78% (Figura 1), o que está de acordo com o descrito por Souza et al. (2010), onde o teor de

7% foi encontrado para sementes originadas de frutos maduros. Já no primeiro minuto de desidratação, observou-se um decréscimo significativo (33%) no teor de água da semente de 7,78 para 5,16%. Com cinco minutos, a perda de água foi significativa em relação à semente sem desidratação, chegando em 3,03 % de água. A partir deste período, a perda de água foi estabilizada. Porém, notou-se que no último tempo de exposição à sílica gel, 60 minutos, a quantidade de água restante na semente representou apenas 23% (1,81 %) do conteúdo original, mostrando assim uma grande redução no teor de água ao longo da desidratação.

A semente de *P. angulata* é considerada ortodoxa, uma vez que suporta a redução do grau de umidade para níveis baixos (Souza et al., 2014). O armazenamento de sementes ortodoxas com reduzido teor de água possibilita a manutenção da viabilidade dos materiais biológicos por mais tempo, uma vez que a taxa respiratória será reduzida (Nascimento, 2009).

Em relação à germinação, tanto as sementes apenas desidratadas (controle –NL) quanto as sementes que foram também imersas em NL (criopreservadas), obtiveram 100% de germinação em todos os tempos de desidratação, ou seja, o processo de desidratação não é necessário para criopreservação de sementes de *P. angulata* mostrando que o conteúdo de água das sementes não causa danos celulares durante o congelamento e descongelamento das mesmas.

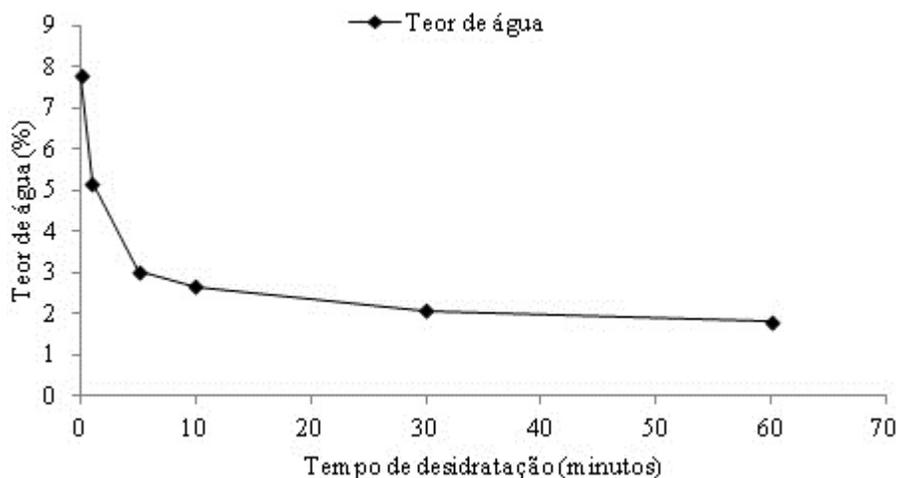


Figura 1 – Porcentagem do teor de água (%) das sementes de *P. angulata* L. nos diferentes tempos de desidratação (min) em sílica gel.

Para o armazenamento de sementes ortodoxas, o conteúdo de água intracelular deve estar entre 10 a 12% de acordo com Marcos Filho (2005) enquanto que para Bewley e Black (1986) são recomendados percentuais entre 8 e 9%. Como uma regra geral, a criopreservação de sementes ortodoxas pode ser atingida com sucesso quando as sementes contenham naturalmente, baixos teores de água intracelular (Ferrari et al., 2016). Isso justifica a tolerância das sementes de *P. angulata* ao congelamento mesmo sem passar pela desidratação uma vez que o teor de água presente nessas sementes, como demonstrado neste trabalho, é baixo.

Um baixo conteúdo de água intracelular é, portanto, desejado para que a criopreservação ocorra com sucesso em materiais vegetais (Benson, 2008; Engelmann, 2011) como ocorreu com a *P. angulata* neste trabalho. Isso porque, é essencial evitar a formação de cristais de gelo no meio intracelular, sendo a temperatura entre -15 °C a -60 °C crítica, pois é a faixa em que ocorre a nucleação e formação de cristais de gelo. Além disso, o explante é submetido duas vezes a essas faixas de temperatura, a primeira durante o resfriamento e a segunda durante o reaquecimento (Mazur, 1984). Dessa forma, o conteúdo de água das sementes entre 10 e 30% pode levar a uma diminuição da germinação após a criopreservação devido à formação desses cristais durante o processo de congelamento (Stanwood, 1985). Ferrari et al, (2016), por exemplo, obtiveram uma porcentagem de germinação superior a 94% em sementes criopreservadas de bromélias *Encholirium spectabile* Martius ex Schultes

f. contendo 8,44% de água após a colheita de frutos maduros.

Para as variáveis número de folhas, médias de 4,083 (-NL) e 4,39 (+NL), e comprimento da parte aérea, médias de 6,92 (-NL) e 7,7 (+NL), não houve diferenças significativas de acordo com o tempo de desidratação em sílica gel. Já para a variável comprimento da raiz principal, houve diferença significativa apenas nos maiores tempos de exposição à sílica gel, 30 e 60 minutos, apresentando assim um menor tamanho em relação as demais (Tabela 1).

A reidratação dos tecidos é essencial para a retomada de crescimento por parte do eixo embrionário. Além disso, a absorção de água desempenha outros papéis que contribuem para o sucesso da germinação, como o aumento de volume da semente, o que provoca o rompimento da casca (Carvalho; Nakagawa, 2000). Dessa forma, para as sementes que ficaram por mais tempo expostas à sílica e obtiveram menor crescimento radicular, pode-se inferir que houve um retardo na germinação uma vez que as mesmas continham menor quantidade de água e para se atingir a quantidade necessária para desencadear o começo da germinação, gastaram um tempo maior. Conseqüentemente, o crescimento das raízes também foi retardado apresentando um tamanho (cm) menor do que os demais no dia avaliado.

Outro ponto importante a ser considerado é de que a desidratação possa ter interferido na viabilidade das células a ponto de causar problemas na germinação em si. Porém, isso só poderia ser comprovado através de estudos complementares como, por exemplo, a nível anatômico.

Tabela 1 – Média do número de folhas, comprimento da parte aérea (cm) e comprimento da raiz principal (cm) aos 30 dias, de acordo com os diferentes tempos de desidratação das sementes de *P. angulata* L. em sílica gel.

Tempo de Desidratação (min)	Número de Folhas		Comprimento da Parte aérea (cm)		Comprimento da Raiz Principal (cm)	
	(-NL)	(+NL)	(-NL)	(+NL)	(-NL)	(+NL)
0	4,50 aA*	4,00 aA	7,63 aA	7,26 aA	9,56 aA	8,63 Aa
1	4,33 aA	4,33 aA	7,46 aA	7,10 aA	9,53 aA	8,60 Aa
5	4,00 aB	5,00 aA	6,90 aA	7,70 aA	9,43 aA	8,76 aA
10	3,66 aA	4,50 aA	6,86 aB	8,60 aA	8,80 aA	9,16 Aa
30	3,50 aB	4,50 aA	5,96 aB	7,50 aA	7,93 bA	7,26 bA
60	4,50 aA	4,00 aA	6,60 aB	8,00 aA	8,13 bA	7,43 bA

* Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Em relação às sementes criopreservadas e não criopreservadas, de maneira geral, notou-se um aumento do número de folhas e do comprimento da parte aérea para as que passaram pelo NL, com o aumento dos tempos de desidratação. O efeito da temperatura ultra baixa seguido do descongelamento, pode causar danos no revestimento das sementes e dessa forma, o meio de cultivo pode penetrar com mais facilidade levando a um desenvolvimento mais rápido dos embriões dessas sementes (Nikishina et al. 2001; Popova et al. 2003). Hu et al., (2013), obtiveram uma maior taxa de germinação em sementes dessecadas e criopreservadas (85-90%) do que as não criopreservadas (79%).

Para à aclimatização foram utilizadas plântulas de sementes que não passaram pela desidratação uma vez que este não diferiu significativamente dos demais, e os maiores tempos, 30 e 60 minutos para se comparar o efeito da desidratação. Os resultados demonstraram que,

independentemente do período de desidratação anterior à criopreservação (0, 30, 60 min), após 45 dias 100% das plantas transplantadas para o substrato sobreviveram ao processo. Além disso, não houve diferenças significativas nos parâmetros avaliados, indicando que a criopreservação não afetou o desenvolvimento normal das plantas na fase de aclimatização (Figura 2).

A aclimatização é um dos processos mais críticos e com dificuldades de sucesso na cultura de tecidos. Isso porque, durante o cultivo *in vitro* ocorrem mudanças na anatomia, morfologia e fisiologia das plantas influenciando assim, no crescimento, no desenvolvimento, na aclimatização e na sobrevivência das plantas micropropagadas (Pasqual et al., 2011). Contudo, nesse trabalho, as plantas de *P. angulata*, apresentaram uma alta capacidade de aclimatização, não havendo dificuldades nessa etapa levando a sobrevivência de todas as plantas.

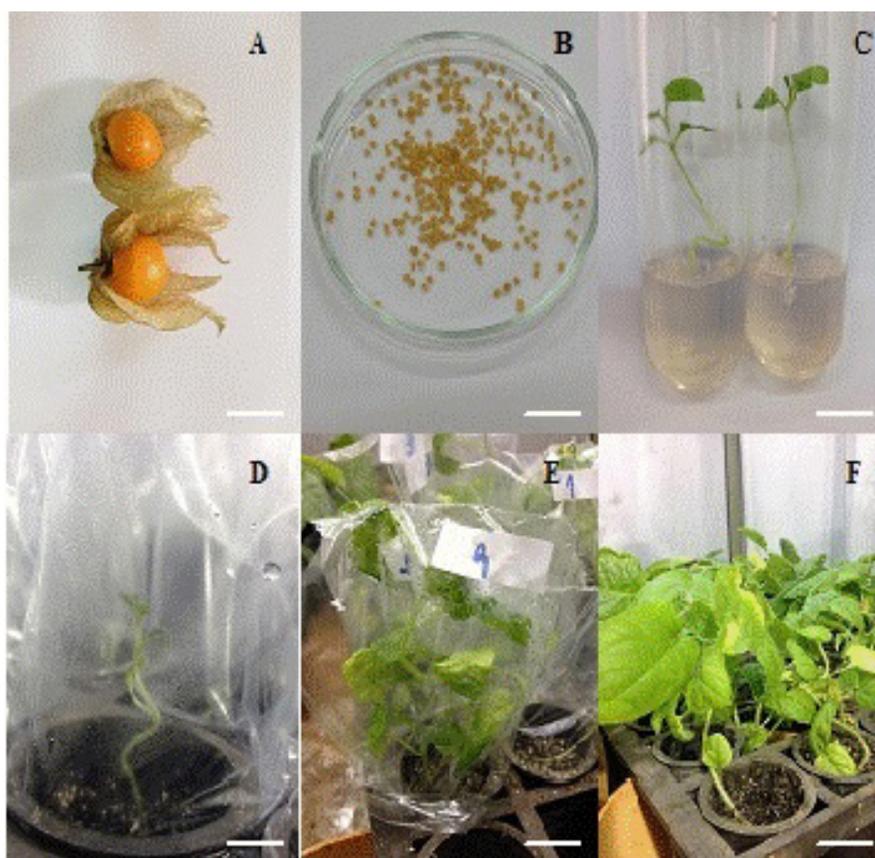


Figura 2 – Frutos maduros (A); sementes (B); plântulas normais germinadas *in vitro* (C); aspecto da aclimatização de plântulas criopreservadas (D-F) de *Physalis angulata* L. Barra: B=1,5; A, C e D=1,0; E e F = 2,5cm.

CONCLUSÕES

Sementes de *Physalis angulata* podem ser armazenadas em longo prazo sem perda de seu potencial germinativo por meio da criopreservação.

A etapa de desidratação não é necessária uma vez que com o teor de água inicial em torno de 7,78%, foram germinadas 100% das sementes que foram anteriormente criopreservadas.

Foram obtidas 100% de plântulas normais aclimatizadas.

AGRADECIMENTOS

À CAPES, CNPq e FAPEMIG pela concessão de recursos financeiros.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BENSON, E. E. Cryopreservation theory. In: REED, B. M. **Plant cryopreservation: A practical guide**. New York: Springer, 2008. p. 15-32.
- BERTONI, B. W. et al. Genetic diversity among natural populations of *Mandevilla velutina*. **Horticultura Brasileira**. 28(2): 209-213, 2010.
- BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: Physiology of development and germination**. 2. ed. New York: Plenum Press, 1986. 445 p.
- ENGELMANN, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**. 47(1):5-16, 2011.
- FERRARI, E. A. P. et al. Cryopreservation of seeds of *Encholirium spectabile* Martius ex Schultes f. by the vitrification method. **Revista Ciência Agrônômica**. 47(1):172-177, 2016.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: A computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**. 35(6):1039-1042, 2011.
- HU, W. H. et al. Cryopreservation the seeds of a Taiwanese terrestrial orchid, *Bletilla formosana* (Hayata) Schltr. by vitrification. **Botanical Studies**. 54(1):1-7, 2013.
- KACZMARCZYK, A. et al. Cryopreservation of threatened native Australian species what have we learned and where to from here? **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**. 47 (1):17-25, 2011.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais do Brasil: Nativas e exóticas**. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. 544p.
- MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: Fealq, 2005. 495 p.
- MAZUR, P. Freezing of living cells: Mechanisms and applications. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, 247(3): 125-142, 1984.
- MELETTI, L. M. M. et al. Criopreservação de sementes de seis acessos de maracujazeiro. **Scientia Agraria Paranaensis**, 6(1-2):13-20, 2007.
- MOSCHETTO, A. B. **Novidade no pomar**. 2005. Disponível em: <http://revistagloborural.globo.com/EditoraGlobo/componentes/article/edg_article_print/1,3916,972755-1641-1,00.html>. Acesso em: 5 de fevereiro de 2016.
- MURASHIGE T, SKOOG F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**,15(3):473-497, 1962.
- NASCIMENTO, W. M. (Org.). **Tecnologia de sementes de hortaliças**. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, 2009. 432p.
- NIKISHINA, T. V. et al. Effect of cryopreservation on seed germination of rate tropical orchids. **Russian Journal of Plant Physiology**, 48(6):810-815, 2001.
- PASQUAL, M. et al. Influência da qualidade de luz e silício no crescimento *in vitro* de orquídeas nativas e híbridas. **Horticultura Brasileira**, 29(3):324-329, 2011.
- PENCE, V. C. Evaluating costs for the *in vitro* propagation and preservation of endangered plants. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, 47(1):176-187, 2011.
- POPOV, A. S. et al. The development of juvenile plants of the hybrid orchid *Bratonia* after seed cryopreservation. **Cryo-Letters**. 25(3):205-221, 2004.
- REED, B. M. **Plant cryopreservation: A practical guide**. Berlin: Springer. 2008. 513p.
- RUFATO, L. et al. **Aspectos técnicos da cultura de Physalis**. Lages: CAV/UEDESC. 2008. 100p.
- SILVA K.N.; AGRA, M. F.. Estudo farmacobotânico comparativo entre *Nicandra physalodes* e *Physalis angulata* (Solanaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 15(4):344-351, 2005.

- SOUZA, C. L. M. et al. Morfologia de sementes e desenvolvimento pós-seminal de *Physalis angulata* L. **Acta Botânica**. 24(4):1082-1085, 2010.
- SOUZA, M. O. et al. Preconditioning of *Physalis angulata* L. to maintain the viability of seeds. **Acta Amazonica**, 44(1): 153-156, 2014.
- SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 2005. 640p.
- 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. et al. Solanaceae in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. 2015. Jardim **Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB14696>>. Acesso em: 17 Mar. 2016.
- TOMASSINI, T. C. B. et al. Gênero *Physalis* – uma revisão de vitaesteróides. **Química nova**, 23(1): 47-57, 2000.