



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ANA BEATRYZ PRENZIER SUZUKI

**CRIOPROTETORES na CONSERVAÇÃO em NITROGÊNIO
LÍQUIDO de ORQUÍDEAS BRASILEIRAS**

Londrina
2017

ANA BEATRYZ PRENZIER SUZUKI

**CRIOPROTETORES na CONSERVAÇÃO em NITROGÊNIO
LÍQUIDO de ORQUÍDEAS BRASILEIRAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Agronomia da Universidade Estadual de
Londrina, como requisito para obtenção do título
de Doutora em Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Tadeu de Faria

Londrina
2017

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

Prenzier Suzuki, Ana Beatriz.

CRIOPROTETORES na CONSERVAÇÃO em NITROGÊNIO LÍQUIDO de ORQUÍDEAS BRASILEIRAS / Ana Beatriz Prenzier Suzuki. - Londrina, 2017.
87 f. : il.

Orientador: Ricardo Tadeu de Faria.

Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2017.
Inclui bibliografia.

1. Criopreservação de Plantas - Tese. 2. Orchidacea - Tese. 3. Conservação - Tese. 4. Crioprotetores - Tese. I. Tadeu de Faria, Ricardo . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. III. Título.

ANA BEATRYZ PRENZIER SUZUKI

**CRIOPROTETORES na CONSERVAÇÃO em NITROGÊNIO LÍQUIDO
de ORQUÍDEAS BRASILEIRAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Agronomia da Universidade Estadual de Londrina,
como requisito para obtenção do título de Doutora
em Agronomia.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof.^a. Dr.^a. Lúcia Sadayo Assari Takahashi
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof.^a. Dr.^a Mauren Sorace
Universidade Estadual de Maringá – UEM

Dr. Gilberto Rostirolla Batista de Souza
Universidade Estadual Paulista - UNESP/FCAV

Prof. Dr. Guilherme Biz
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof.^a. Dr.^a Christina da Silva Wanderley
Centro Universitário Filadélfia - UNIFIL

Prof.^a. Dr.^a. Inês Cristina de Batista Fonseca
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 5 de maio de 2017.

Dedica

Ao meu eterno amigo Bud (in memória)
e ao Maurício meu companheiro de
todas as horas.

AGRADECIMENTOS

- Primeiramente a Deus por ter me dado saúde, força e lucidez para chegar até aqui e concluir mais uma etapa da minha vida.
- À Universidade Estadual de Londrina, especificamente ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, pela acolhida e pelo interesse demonstrado na execução e conclusão do trabalho, e por todo o apoio recebido dos integrantes do departamento pela prontidão e dedicação no atendimento prestado aos alunos.
- À CAPES pelo suporte financeiro.
- Ao meu orientador Professor Dr. Ricardo Tadeu de Faria pelo empenho dedicado à elaboração deste trabalho, ensinamento e dedicação dispensados no auxílio à concretização dessa tese. A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Agronomia pela paciência, dedicação e ensinamentos disponibilizados nas aulas, cada um de forma especial contribuiu para a conclusão desse trabalho e conseqüentemente para minha formação profissional.
- Meus agradecimentos em especial aos amigos Douglas, Edilene e Guilherme, companheiros de trabalhos que sempre se dispuseram e ajudaram quando mais precisei, fizeram parte da minha formação e que vão continuar presentes em minha vida. A todos os colegas de laboratório que participaram dessa caminhada.
- À minha amiga Thaís, sempre disposta a ajudar, pelas alegrias, tristezas, preocupações, discussões e dores compartilhadas; que nos momentos de grande dificuldade sempre me apoiou e ajudou a seguir em frente.
- À minha companheira de todas as horas Ciça, que me alegra entre uma pausa e outra.
- Ao Maurício, pessoa com quem amo partilhar a vida, que de forma especial e carinhosa sempre me incentivou, deu força e coragem além de me apoiar nos momentos de dificuldades.
- À minha família, ao meu pai Gilson (in memória), à minha mãe Many, às minhas irmãs Polyana, Ivy e Byanca, aos tios Ney, Suzy, Vera e Eliana, aos sobrinhos Yann e Kayê, e especialmente à minha avó Inah (in memória), pois sem eles eu não chegaria até aqui. Eles se dedicaram a me ensinar que tudo o que buscamos existe em algum lugar do futuro, nosso único meio de locomoção até lá são os nossos pensamentos e ações, em que a educação e o conhecimento são nossos combustíveis.
- Por fim, gostaria de agradecer a todos os amigos e familiares pelo carinho e pela compreensão nos momentos em que a dedicação aos estudos foi exclusiva, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para que esse trabalho fosse realizado: meu eterno AGRADECIMENTO.
- A todos que já falei, agradeço por acreditarem no meu potencial, na minha profissão, nas minhas ideias, nos meus devaneios, principalmente quando nem eu mais acreditava.

“Pouco conhecimento faz com que as pessoas se sintam orgulhosas. Muito conhecimento, que se sintam humildes. É assim que as espigas sem grãos erguem desdenhosamente a cabeça para o céu, enquanto que as cheias as baixam para a terra, sua mãe”

(Leonardo da Vinci)

SUZUKI, Ana Beatryz Prenzier. **Crioprotetores na Conservação em Nitrogênio Líquido de Orquídeas Brasileiras**. 2017. 92f. Tese de Doutorado em Agronomia – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

RESUMO

O comércio de orquídeas nativas teve como prática o extrativismo, que aliado à destruição de seus habitats naturais e avanço da agricultura, levou à extinção ou à quase extinção de muitas espécies. Os bancos de germoplasma são ferramentas importantes, sendo a forma mais simples de conservação e manutenção de materiais genéticos. A criopreservação é o processo de conservação em que o material biológico é submetido à temperaturas ultrabaixas utilizando nitrogênio líquido (-196°C). Entretanto, para que as estruturas possam ser recuperadas após a criopreservação é necessário a adição de substâncias crioprotetoras. O objetivo do presente trabalho foi desenvolver protocolos para a criopreservação de sementes e políneas de orquídeas brasileiras. O primeiro realizado com sementes de *Catasetum atratum*, submetidas aos tratamentos com as soluções crioprotetoras glicerol, sacarose, PVS2 e floroglucinol, isolados ou combinados e dois controles. O segundo realizado com sementes de *Cattleya walkeriana*. Os tratamentos foram compostos pela solução de vitrificação de plantas – PVS2 e diferentes concentrações de floroglucinol variando de 0 a 5% e um controle sem adição de PVS2 e sem floroglucinol. O terceiro realizado criopreservação com políneas de *Oncidium baueri*, utilizando dois controles e tratamentos compostos por glicerole e sacarose isolados e combinados, solução PVS1, PVS2, PVS2 + floroglucinol e PVS3. Nos experimentos com as espécies *C. atratum* e *C. walkeriana* foram avaliadas a porcentagem de sobrevivência das sementes e posteriormente a formação de protocormos, altura da parte aérea, comprimento de raiz e massa seca das plântulas. No experimento com *O. baueri*, foi avaliado a sobrevivência da polínea através da formação de cápsulas após a polinização artificial e posteriormente a viabilidade das sementes. Os dados de *C. atratum* foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5%. Para *O. baueri*, a formação de cápsulas foi avaliada através de modelos lineares generalizados utilizando a distribuição binomial e posteriormente submetidos a teste Tukey de comparação de médias. Em *C. walkeriana* os dados foram submetidos primeiro ao teste Tukey para verificar a diferença entre os tratamentos e posteriormente a regressão cubica avaliando-se as melhores concentrações do floroglucinol. Para as sementes de *C. atratum* e políneas de *O. baueri* a solução de PVS2 isoladamente proporcionou maior porcentagem de sobrevivência 67,7% e 82,0%, respectivamente. Em sementes de *C. walkeriana* os melhores resultados obtidos nos tratamentos com PVS2 +1% de FL com 84,98%, e PVS2 +2% de FL com 84,21% de sobrevivência.

Palavras-chave: Criopreservação. Pólen. PVS. Sementes. Vitrificação.

SUZUKI, Ana Beatriz Prenzier. **Cryoprotectants on the Conservation of Liquid Nitrogen from Brazilian Orchids**. 2017. 92f. Tese de Doutorado em Agronomia – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

ABSTRACT

The trade in native orchids was practiced by extractivism, which combined with the destruction of their natural habitats and the advancement of agriculture, led to the extinction or near extinction of many species. Germplasm banks are important tools, the simplest form of conservation and maintenance of genetic material. Cryopreservation is the conservation process in which the biological material is subjected to ultra low temperatures using liquid nitrogen (-196°C). However, in order for the structures to be recovered after cryopreservation, the addition of cryoprotective substances is necessary. The aim of the present work was to develop protocols for the cryopreservation of Brazilian orchid seeds and polineas. The first was made with *Catasetum atratum* seeds. submitted to the treatments with the cryoprotectant solutions glycerol, sucrose, PVS2 and phloroglucinol, isolated or combined and two controls. The second performed with *Cattleya walkeriana* seeds. The treatments were composed of the solution of plant vitrification - PVS2 and different concentrations of phloroglucinol ranging from 0 to 5% and a control without addition of PVS2 and without phloroglucinol. The third was performed cryopreservation with *Oncidium baueri* polineas, using two controls and treatments composed of glycerol and sucrose isolated and combined, solution PVS1, PVS2, PVS2 + phloroglucinol and PVS3. In the experiments with the species *C. atratum* and *C. walkeriana*, the percentage of seed survival was evaluated and later protocorms formation, shoot height, root length and dry mass of the seedlings were evaluated. In the experiment with *O. baueri*, it was evaluated the survival of the pollinate through the formation of capsules after artificial pollination and later the viability of the seeds. The data of *C. atratum* were submitted to analysis of variance (ANOVA) and the averages were compared by the Tukey test at 5%. For *O. baueri*. The formation of capsules was evaluated through generalized linear models using the binomial distribution and later submitted to Tukey test of means comparison. In *C. walkeriana* the data were submitted first to the Tukey test to verify the difference between the treatments and later the cubic regression, evaluating the best concentrations of phloroglucinol. For the *C. atratum* and *O. baueri* pollinated seeds, the PVS2 solution alone provided a higher survival rate of 67.7% and 82.0%, respectively. In the seeds of *C. walkeriana* the best results were obtained in treatments with PVS2 + 1% of phloroglucinol with 84.98%, and PVS2 + 2% of phloroglucinol with 84.21% of survival.

Keywords: Cryoconservation. Pollen. PVS. Seeds. Vitrification.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Distribuição mundial das subfamílias de Orchidaceae: A) Apostasioidae; B) Vanilloidae; C) Cypripedioidae; D) Orchidoideae e E) Epidendroidae.	18
Figura 2:	Constituintes da flor de orquídea: (A) Inflorescência de orquídea. (B) Segmento do perianto distendido. (C) Vista lateral do ginostêmio e ovário. (D) Vista ventral do ginostêmio evidenciando a cavidade estigmática. (E) Capuz da antera. (F) Polínias com caudículas.	20
Figura 3:	Flor masculina de <i>Catasetum atratum</i> Lindl.	22
Figura 4:	Flor de <i>Oncidium baueri</i> Lindl.	23
Figura 5:	Mapa de distribuição da população de <i>Cattleya walkeriana</i> Gardner.	24
Figura 6:	Detalhe da flor de <i>Cattleya walkeriana</i> . tipo.	25
Figura 7:	Polínea de orquídea: A – opérculo com as políneas; B – retirada do opérculo com as políneas; C – polínea sendo introduzida no estigma; D – Foto da polínea em lupa estereoscópica.	26
Figura 8:	Cápsula madura de <i>Oncidium baueri</i> Lindl.	27
Figura 9:	Sementes da orquídea <i>Oncidium baueri</i> Lindl. extraídas de um único fruto.	28
Figura 10:	Crescimento in vitro de orquídeas <i>Cattleya walkeriana</i> em meio de cultura.	29
Figura 11:	Foto em lupa estereoscópica de sementes da orquídea <i>Catasetum atratum</i> submetidas a teste de tetrazólio (A) – semente com embrião viável; (B) – semente com embrião inviável; (C) – sementes vazias.	31
Figura 12:	Detalhe da flor masculina de <i>Catasetum atratum</i>	44
Figura 13:	Sementes de <i>Catasetum atratum</i> criopreservadas em solução PVS2 e posteriormente submetidas a teste de tetrazólio para verificar a sobrevivência do embrião, (A) – Embrião viável; (B) – Embrião não viável; (C) sementes sem embrião; (D) – Germinação das sementes criopreservadas em solução de PVS2 formando os protocormos após 180 dias da germinação.	47
Figura 14:	Índice de proporção parte aérea-raiz de plântulas de <i>Catasetum atratum</i> 360 dias após descongelamento, em que plantas com	

	proporcionalidade mais próximas de 1:2 (0,5) possuem maior probabilidade de desenvolvimento.	51
Figura 15:	Plântulas de <i>Catasetum atratum</i> obtidas de sementes criopreservadas submetidas a diferentes tratamentos com soluções crioprotetoras 360 dias após a germinação.	51
Figura 16:	Sementes criopreservadas e tratadas com PVS2 + 1% de floroglucinol de <i>Cattleya walkeriana</i> submetidas a teste tetrazólio para verificar a viabilidade do embrião através da coloração: A – Sementes viáveis; B – Sementes inviáveis; C – Sementes vazias.	58
Figura 17:	Regressão cúbica da porcentagem de sobrevivência das sementes de <i>Cattleya walkeriana</i> submetidas a tratamento com solução de Solução de Vitrificação de Plantas 2 (PVS2) com diferentes concentrações de floroglucinol.	60
Figura 18:	Plântulas de <i>Cattleya walkeriana</i> cultivadas <i>in vitro</i> : plantas correspondentes aos melhores tratamentos com adição de solução crioprotetora com 1% e 2% de floroglucinol (T5 e T6) em comparação com a planta criopreservada sem adição de nenhuma solução (T0) e plantas cultivadas sem serem submetidas a criopreservação (Sem NL) não apresentando diferença na morfologia.	62
Figura 19:	Sobrevivência das políneas de <i>Oncidium baueri</i> determinada através da formação de cápsulas após polinização com políneas tratadas com soluções crioprotetoras 180 dias após a polinização.	71
Figura 20:	A - Detalhe da flor e da polínea; B - Foto com lupa estereoscópica da polínea de orquídea <i>Oncidium baueri</i> ; C - Cápsulas formadas após polinização com políneas criopreservadas após 180 dias.	73
Figura 21:	Viabilidade das sementes de cápsulas formadas por polinização artificial com políneas tratadas com soluções crioprotetoras.	74
Figura 22:	Sobrevivência dos embriões de sementes de cápsulas formadas por políneas tratadas com PVS2 submetidos a criopreservação determinada através de teste tetrazólio. A – Embriões viáveis. B – Embriões inviáveis. C – Sementes vazias.	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Composição dos tratamentos com soluções crioprotetoras utilizados para criopreservação de sementes de <i>Catasetum atratum</i>	45
Tabela 2:	Sobrevivências das sementes de <i>Catasetum atratum</i> submetidas às diferentes soluções crioprotetoras logo após o descongelamento e aos 180 DAG através da formação de protocormos.	49
Tabela 3:	Altura da parte aérea (APA), massa seca da parte aérea (MSPA), comprimento da raiz (CR) e massa seca da raiz (MSR) de <i>Catasetum atratum</i> , 360 dias após a germinação (DAG), referente aos tratamentos com e sem diferentes soluções crioprotetoras.	50
Tabela 4:	Sobrevivência das sementes de <i>Cattleya walkeriana</i> submetidas à solução de criopreservação Solução de Vitriificação de Plantas 2 (PVS2) com diferentes concentrações de floroglucinol (FL).....	59
Tabela 5:	Altura da parte aérea (APA), massa seca da parte aérea (MSPA), comprimento da raiz (CR) e massa seca da raiz (MSR) e índice de proporcionalidade parte aérea-raiz (IP) aos 300 dias após a germinação de referente aos tratamentos com e sem diferentes soluções crioprotetoras em sementes de <i>C. walkeriana</i>	61

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1. FLORICULTURA E COMERCIALIZAÇÃO DE ORQUÍDEAS.....	17
2.2. ORCHIDACEAE	18
2.3. <i>CATASETUM</i>	21
2.4. <i>ONCIDIUM</i>	22
2.5. <i>CATTLEYA</i>	23
2.6. POLINIZAÇÃO.....	25
2.7. CÁPSULAS E SEMENTES	27
2.8. SEMENTES ORTODOXAS E RECALCITRANTES	30
2.9. VIABILIDADE DAS SEMENTES.....	30
2.10. CRIOPRESERVAÇÃO	31
2.10.1. Histórico.....	33
2.10.2. Crioprotetores	34
2.10.3. Métodos para a criopreservação vegetal	36
2.10.3.1. Metodologia Clássica.....	37
2.10.3.2. Metodologia Contemporânea.....	37
2.11. CRIOPRESERVAÇÃO DE ORQUÍDEAS	38
3. ARTIGOS	41
3.1. SOLUÇÕES CRIOPROTETORAS NA CRIOPRESERVAÇÃO DE SEMENTES DA ORQUÍDEA BRASILEIRA EM RISCO DE EXTINÇÃO <i>Catasetum atratum</i> Lindl.	41
3.1.1. Resumo	41
3.1.2. Introdução	42
3.1.3. Material e métodos.....	43

3.1.4.	Resultados e discussão	46
3.1.5.	Conclusão.....	53
3.2.	FLOROGLUCINOL NA CRIOPRESERVAÇÃO DE SEMENTES DA ORQUÍDEA EM RISCO EXTINÇÃO <i>Cattleya walkeriana</i> Gardner	54
3.2.1.	Resumo	54
3.2.2.	Introdução	55
3.2.3.	Material e métodos.....	56
3.2.4.	Resultados e discussão	58
3.2.5.	Conclusão.....	64
3.3.	CRIOPROTETORES NA CONSERVAÇÃO EM NITROGÊNIO LÍQUIDO DE POLÍNEAS DA ORQUÍDEA BRASILEIRA <i>Oncidium baueri</i> Lindl.	65
3.3.1.	Resumo	65
3.3.2.	Introdução	66
3.3.3.	Material e métodos.....	68
3.3.4.	Resultados e discussão	70
3.3.5.	Conclusão.....	75
4.	CONCLUSÕES GERAIS	76
	REFERÊNCIAS.....	77

1. INTRODUÇÃO

A família Orchidaceae é considerada um dos maiores grupos de plantas em número de espécies (CANTUÁRIA et al., 2014). As orquídeas são amplamente difundidas, apresentam cerca de 800 gêneros e 24.500 (DRESSLER, 1993, 2005), mas com estimativa de aproximadamente 30.000 segundo Joppa, Roberts e Pimm (2011). Ocorrem em quase todos os ecossistemas, com exceção da zona polar. A maior diversidade se apresenta nas regiões tropicais e subtropicais (NIKISHINA et al., 2001, 2007; JOPPA; ROBERTS; PIMM, 2011) e, no Brasil, são encontradas cerca de 10% das espécies desse grupo (DRESSLER, 2005; SOUZA; LORENZI, 2012). Possivelmente, a amplitude geográfica da sua distribuição seja beneficiada pela dissipação a longas distâncias proporcionada por suas numerosas e diminutas sementes (BENZING, 1981). Em seus habitats naturais das áreas tropicais ou subtropicais, as orquídeas epífitas crescem em troncos de árvores ou em galhos sob cobertura de folhas (LONE et al., 2010).

Para o Brasil, são citados 221 gêneros e 2.497 espécies e, destes, 28 gêneros e 1596 espécies são endêmicas. O estado que apresenta maior diversidade é Minas Gerais com 894 espécies, seguido de Rio de Janeiro com 829, São Paulo com 821 e Espírito Santo com 686 espécies. O Paraná é o quinto estado com maior número de ocorrência de Orchidaceae, com 116 gêneros e 618 espécies. A Mata Atlântica é o que abriga a maior riqueza específica com mais de 1.500 espécies registradas, embora a família esteja representada em todos os domínios fitogeográficos (REFLORA, 2016).

Algumas espécies têm importância econômica, como a baunilha extraída dos frutos de *Vanilla planifolia*. Outras espécies possuem valor ornamental, como as *Cattleya*, *Phalaenopsi*, *Oncidium* e *Catasetum* (JUDD et al., 2009). Existem ainda aquelas com propriedades medicinais como *Anoectochilus formosanu*, (SHIAU et al., 2002).

O comércio de orquídeas nativas teve como prática o extrativismo, que aliado à destruição de seus habitats naturais pelo avanço da agricultura, levou à extinção ou à quase extinção de muitas espécies. Martinelli e Moraes (2013) avaliaram 439 espécies de Orchidaceae no Brasil e 169 foram classificadas em risco de extinção.

Os bancos de germoplasma são ferramentas importantes, sendo a forma mais simples de conservação e manutenção de materiais genéticos, além de serem mais seguros do que outras metodologias de conservação de plantas *ex situ* sujeitas a ataque de doenças, pragas e outras intempéries.

A criotecnologia tem conquistado destaque, tanto na medicina reprodutiva humana e animal, quanto na preservação de espécies vegetais ameaçadas ou não de extinção, através da criopreservação de sementes e suas partes (embriões, pólen, tecidos e células). A criopreservação tem como princípio básico a redução da temperatura em nitrogênio líquido à -196 °C (PEGG, 2007) como forma de desacelerar o metabolismo celular permitindo que sementes e tecidos sejam conservados por períodos indeterminados, o que possibilita a retomada do desenvolvimento celular normal após o armazenamento.

As técnicas utilizadas em plantas são controle da taxa de refrigeração, vitrificação, encapsulamento, desidratação e preservação da gema dormente (REED, 2008). Estas técnicas preveem o armazenamento simultâneo de diversas partes da orquídea. Em sementes, técnicas de vitrificação têm mostrado um maior potencial de tolerância ao estresse causado pela criopreservação (MERRITT et al., 2014). No entanto, o sucesso da criopreservação depende de uma delicada e complexa interação entre importantes variáveis, que envolve tanto questões físicas, como o volume da solução de criopreservação e as taxas de resfriamento, quanto questões químicas referentes à composição da solução de criopreservação. Para reduzir ou evitar as injúrias induzidas pelas baixas temperaturas a adição de substâncias que proporcionem uma crioproteção celular e tecidual (VAJTA; KUWAYAMA; VANDERZWALMWN, 2007).

Essas substâncias, conhecidas como agentes crioprotetores (ACPs), são fundamentais para resultados satisfatórios na criopreservação. Embora os ACPs sejam necessários e utilizados nos protocolos de criopreservação, os mecanismos que conferem proteção ao material biológico, bem como a toxicidade e a metabolização celular destes agentes, não são completamente esclarecidos e abordados na literatura, principalmente quando se trata de orquídeas.

O objetivo do presente trabalho foi desenvolver protocolos para a criopreservação de sementes de orquídeas brasileiras das espécies *Catasetum atratum* e *Cattleya walkeriana* e pólen de *Oncidium baueri*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. FLORICULTURA E COMERCIALIZAÇÃO DE ORQUÍDEAS

A cadeia produtiva de flores e plantas ornamentais no Brasil movimentou, no ano de 2015, o valor de R\$ 6,17 bilhões, acumulando crescimento de 8,3% sobre os resultados de 2014. Para 2016, as estimativas preliminares apontam para um total de R\$ 6,64 bilhões, 8,0% sobre o ano anterior (IBRAFLOR, 2016). O Brasil possui uma variedade de flores e plantas ornamentais com grande potencial econômico que aliada à diversidade climática, possibilita o sucesso na exploração deste mercado (OLIVEIRA e BRAINER, 2007).

No Brasil, a profissionalização e o dinamismo comercial da floricultura são fenômenos relativamente recentes. Contudo, a atividade já contabiliza números significativos. Desde 2006 o segmento de flores tem registrado crescimento anual de 5% a 8% em volume e de 4% a 7% em valor. O Brasil conta, atualmente, com cerca de 8 mil produtores de flores e plantas ornamentais. Juntos, eles cultivam mais de 350 espécies com cerca de três mil variedades. Sendo assim, o mercado de flores é um setor importante na economia brasileira, responsável por 215.818 empregos diretos, 78.485 (36,37%) relativos à produção, 8.410 (3,9%) na distribuição, 120.574 (55,87%) no varejo, 8.349 (3,8%) em outras funções, em maior parte como apoio (IBRAFLOR, 2016).

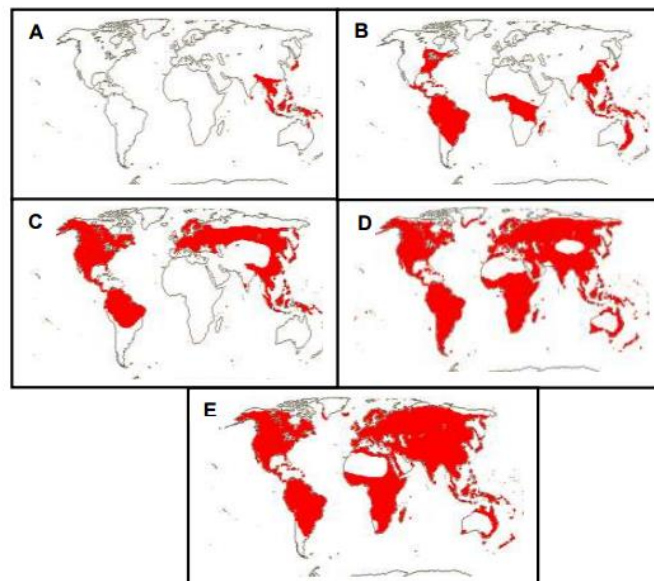
Segundo dados do Instituto Brasileiro de Floricultura (IBRAFLOR, 2016), o Brasil apresentou em 2014 uma área plantada com flores e plantas ornamentais de aproximadamente 15.000 hectares. Esse número é resultado de um aumento recorrente da área destinada a essa atividade no país, já que em 2012 a área foi estimada em torno de 12.000 hectares e em 2013 de 14.000 hectares. Esse aumento representa uma taxa média de crescimento anual de 12,72%. Quando se analisa a distribuição dessa área no ano de 2014, os estados que se destacam são: São Paulo, com quase 7.000 hectares, representando 46% do total nacional, seguido por Rio Grande do Sul e Santa Catarina, com 1.360 e 998 hectares respectivamente, ou 9% e 7% do total. O Paraná apresenta 2% do total (NEVES; PINTO, 2015). O consumo *per capita* nacional de flores e plantas ornamentais é de R\$ 26,00, muito baixo quando comparado a outros países. Na Alemanha e na França, chega a R\$ 195,00 e R\$ 160,00 respectivamente (IBRAFLOR, 2016).

As orquídeas participam do mercado da floricultura por sua beleza, variedade de espécies e pelo valor econômico agregado. O mercado brasileiro tem vantagens na produção e comercialização dessas plantas pelo fato da existência natural de uma diversidade ampla de gêneros e de espécies; de fatores climáticos favoráveis ao cultivo, principalmente pela temperatura e regime hídrico e por apresentar fontes de substratos variáveis, sendo a fibra de coco e a casca de pinus dois exemplos disponíveis no mercado nacional (OLIVEIRA; BRAINER, 2007). A orquideocultura obteve expressivo acréscimo de produtividade, principalmente pela introdução de novas tecnologias associadas a espécies e variedades disponibilizadas no mercado, refletindo um incremento do comércio destas plantas (TAKANE; YANAGISAWA, 2007).

2.2. ORCHIDACEAE

A Orchidaceae é a maior família de plantas em número de espécies entre as monocotiledôneas. É constituída por cerca de 850 gêneros, entre 20.000 a 30.000 espécies e possuem distribuição cosmopolita, encontradas praticamente em todas as regiões, com exceção dos Polos e regiões desérticas. São plantas herbáceas, perenes, terrícolas ou epífitas (DRESSLER, 2005; SOUZA; LORENZI, 2012). A família se subdivide em cinco grandes subfamílias, cuja distribuição geográfica de suas espécies está apresentada na **Erro! Fonte de referência não encontrada.**

Figura 1: Distribuição mundial das subfamílias de Orchidaceae (em vermelho): A) Apostasioideae; B) Vanilloideae; C) Cyripedioideae; D) Orchidoideae e E) Epidendroideae.



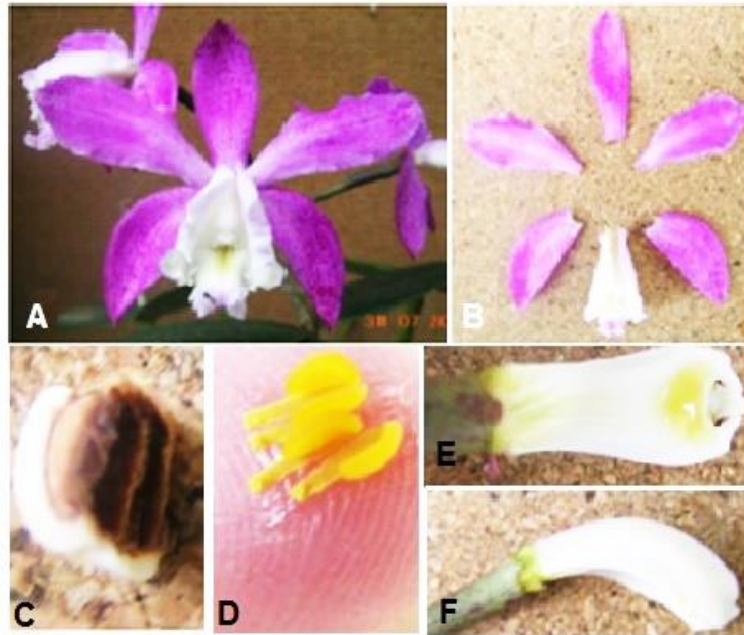
Fonte: Angiosperm Phylogeny Group, (2016).

Apresenta ampla diversidade na região equatorial em países como Colômbia, Equador, Brasil e Peru. Aproximadamente 10% do total de espécies de orquídeas são encontradas no Brasil. Destas, 65% são endêmicas. São encontradas em praticamente todo o território, mas são predominantes em florestas úmidas, principalmente na Mata Atlântica (ZAPPI et al., 2015).

Constituem plantas herbáceas e perenes, as quais se originaram durante o período Cretáceo, quando a maioria das angiospermas se diferenciaram. Em relação ao hábito de crescimento, podem ser epífitas, terrestres ou rupícolas, não existindo espécies parasitas; o crescimento pode ser do tipo monopodial (ereto) ou simpodial (prostrado). Aproximadamente 70% das espécies têm hábito de crescimento epifítico (BLOSSFELD, 1999).

Caracteriza-se ainda por possuir flores hermafroditas, unissexuais, zigomorfas, assimétricas, trímeras, com três sépalas e três pétalas, sendo uma delas, a oposta ao estame fértil, morfologicamente modificada constituindo o labelo. O androceu é constituído de um, dois ou três, estames férteis; o filete é adnado ao estilete formando o ginostêmio. O estigma está, geralmente, na face ventral do ginostêmio. É trilobado, sendo um dos lobos parcialmente estéril, formando o rostelo, uma estrutura membranácea que separa a antera do estigma; a antera é representada por um “capuz” que geralmente cai no processo de retirada do pólen; o pólen na maioria das espécies é unido em políneas, em número de 2, 4, 6 ou 8; o ovário é ínfero, em regra unilocular, com placentação parietal (Figura 2). Os frutos são capsulares e quase secos, raramente carnosos; as sementes são numerosas, minúsculas, com embrião rudimentar, desprovidas de endosperma (RODRIGUES, 2011).

Figura 2: Constituintes da flor de orquídea: (A) Inflorescência de orquídea. (B) Segmento do perianto distendido. (C) Vista lateral do ginostêmio e ovário. (D) Vista ventral do ginostêmio evidenciando a cavidade estigmática. (E) Capuz da antera. (F) Polínias com caudículas.



Fonte: Rodrigues (2011).

As orquídeas, em sua maioria, são usadas para fins ornamentais, devido à sua beleza, todavia tem crescido o número de estudos relacionados à sua função para a indústria alimentícia e farmacológica (FERRARI, 2016). Como exemplo pode ser citado a baunilha (vanilina), extraída do fruto de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews, como essência aromatizante, é a forma mais conhecida de utilização de orquídeas na indústria alimentícia. No entanto, há diversas formas de aproveitamento, como o uso de extrato de tubérculo de *Anacamptis morio* (L.) R. M. Bateman na fabricação de sorvetes, além do uso de várias espécies do gênero *Dendrobium* como alimento e fonte de nutrientes (CHEN et al., 2008). Koyashiki (2014), relata que há estudos em andamento que comprovam a eficácia da ação de substâncias de orquídeas nativas do Paraná no combate ao sarcoma de ovário.

Na homeopatia se tem registro do uso de *Cyrtopodium punctatum* (L.) Lindl. na forma de pomada para o tratamento de furúnculos, fistulas, cicatrização de cortes, frieiras e queimaduras. Em *Dendrobium densifolium* Schltr. foram descobertos compostos com ação anticoagulante (FAN et al., 2001).

2.3. *CATASETUM*

O gênero *Catasetum* Rich. ex Kunth pertence à subfamília Epidendroideae, tribo Cymbidieae, subtribo Catasetinae (PRIDGEON et al. 2009). Seu nome foi proposto em 1822 por Karl Sigismund Kunth, botânico alemão, baseado em informações de Louis-Claude Marie Richard, sendo *Catasetum macrocarpum* Rich. ex Kunth a espécie tipo (MACHNICKI-REIS et al., 2015)

A subtribo Catasetinae é exclusiva das Américas. Sua distribuição ocorre do México ao norte da Argentina e Bolívia, com a maior parte das espécies na América do Sul. O gênero *Catasetum* Rich. Ex Kunth é o mais numeroso das Catasetinae. São descritas 170 espécies de *Catasetum* (PABST; DUNGS, 1975; PRIDGEON et al., 2009; GOVAERTS et al., 2014).

O Brasil é considerado o centro de maior ocorrência, com 103 espécies (BARROS et al., 2015) e seis espécies, são apontadas na literatura para o Estado do Paraná: *C. atratum* Lindl. (Figura 3), *C. cernuum* (Lindl.) Rchb.f., *C. fimbriatum* (Morren) Lindl. & Paxton, *C. micranthum* Barb. Rodr., *C. socco* (Vell.) Hoehne e *C. triodon* Rchb.f. (KERSTEN; SILVA 2001, BARROS et al., 2015).

Os *Catasetum* podem ser epífitas, em sua maioria, ou terrícolas e, ainda rupícolas (HOLST, 1999). As plantas apresentam pseudobulbos fusiformes, eretos, homoblásticos, cobertos por numerosas bainhas paleáceas. Folhas plicadas, planas, cartáceas, concolores, lanceoladas a ovais, atenuadas na base, agudas no ápice. Inflorescência lateral axilar às bainhas do pseudobulbo, racemosa, multiflora; pedúnculo pendente, cilíndrico; brácteas escapais elípticas (FARIA et al., 2016). O gênero se destaca pelo dimorfismo sexual e o mecanismo de disparo do polinário (ROMERO, 1992). Devido ao dimorfismo, a polinização em *Catasetum* é necessariamente cruzada, exceto nos raros casos de hermafroditismo encontrado em algumas espécies.

Figura 3: Flor masculina de *Catasetum atratum* Lindl.



Fonte: Lusorquideas (2017).

2.4. *ONCIDIUM*

O gênero *Oncidium* sw. é um dos maiores da família Orchidaceae. Nativo do continente americano, apresenta distribuição dos Estados Unidos à Argentina, com expressividade no Brasil, que concentra cerca de um terço das espécies válidas. É composto por 315 espécies, sendo 94 espécies no Brasil. Apresenta potencial ornamental em projetos paisagísticos e como flor de corte (FARIA et al., 2006; FERRAREZI; VIEIRA; FARIA, 2007).

Os *Oncidium* são classificados como ervas epífitas, mas podem ocorrer espécies rupícolas com pseudobulbos desenvolvidos ou ocasionalmente reduzidos em tamanho; folhas em número de um a três crescendo a partir do ápice do pseudobulbo; inflorescência racemosa ou panícula, florífera, compartilhando características com os gêneros *Miltonia* Lindl. e *Odontoglossum* Humboldt, Bonpland & Kunth (FARIA; COLOMBO, 2015)

Embora exista ampla diversidade de *Oncidium*, apenas algumas espécies são exploradas comercialmente como plantas envasadas e para corte, dentre elas *Oncidium varicosum* Lindl., *O. flexuosum* Lodd., e *O. baueri* Lindl. visto que essas espécies apresentam como vantagem florescimento em todo o ano exceto em períodos de inverno rigoroso. São muito apreciados no mercado de flor de corte, pois, as hastes são bem ramificadas e

apresentam grande número de flores abertas e botões concomitantemente. São popularmente conhecidas como chuva de ouro, devido à coloração amarela intensa de suas flores (Figura 4).

Figura 4: Flor de *Oncidium baueri* Lindl.



Fonte: o próprio autor.

2.5. *CATTLEYA*

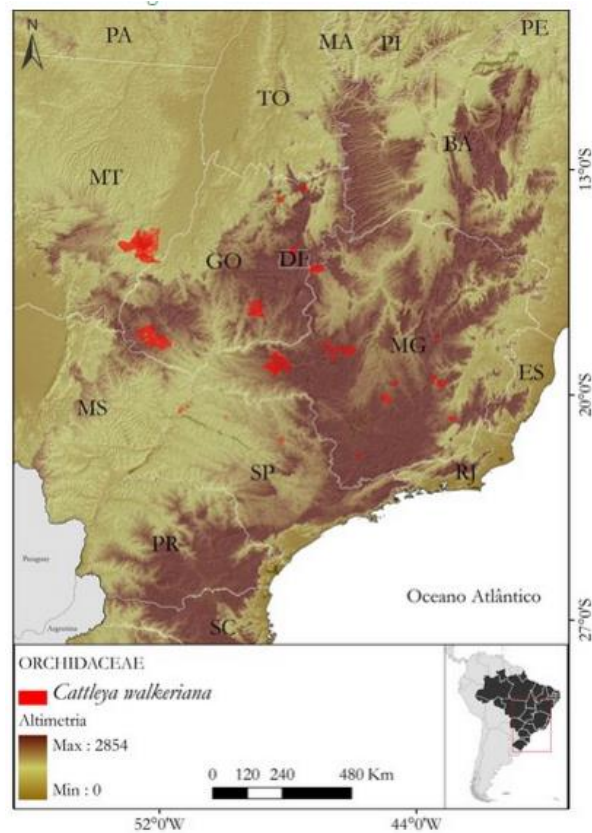
Em geral, esse tipo de orquídeas é epífita e ocorre em florestas úmidas em altitudes que variam do nível do mar até 1500 metros. Aproximadamente 48 espécies fazem parte desse gênero, que estão distribuídas por toda região neotropical. Caracterizam-se por apresentar flores grandes e vivamente coloridas (FARIA; ASSIS; CARVALHO, 2010). As plantas desse gênero apresentam crescimento simpodial (TAKANE; YANAGISAWA; PIVETTA, 2010).

As *Cattleya* estão entre os gêneros com maior número de indivíduos em risco de extinção. São descritas na literatura entre 15 a 20 espécies consideradas em risco. As principais ameaças estão relacionadas à coleta predatória, destruição de hábitat e eliminação dos polinizadores. Muitas espécies de distribuição restrita ou microendêmicas são também ameaçadas por eventos estocásticos (MARTINELLI; MORAES, 2013; CNCFlora, 2017).

Dentre as espécies em risco encontra-se a *Cattleya walkeriana* Gardner. É uma orquídea epífita ou rupícola, que ocorre em diferentes ambientes, desde Floresta

Rupícola, Estacional Semidecidual ao Cerradão (Figura 5). É uma planta considerada de alto valor econômico por seu potencial ornamental (Figura 6). Devido à grande exploração, já foi documentado que muitas subpopulações estão dizimadas em seu ambiente natural e muitas das áreas de crescimento natural estão sendo pressionadas pelo crescimento urbano. Nos últimos 10 anos houve uma redução de 30% da sua população. Essa orquídea é considerada vulnerável (VU) à extinção segundo Martinelli e Moraes (2013).

Figura 5: Mapa de distribuição da população de *Cattleya walkeriana* Gardner.



Fonte: Martinelli e Moraes (2013).

Figura 6: Detalhe da flor de *Cattleya walkeriana*. tipo.



Fonte: Catraca Livre (2017)

2.6. POLINIZAÇÃO

O grão de pólen (do latim *pollen*, *pollinis*, pó muito fino) é a estrutura que carrega os gametas masculinos, sendo formado no interior dos lóculos ou sacos polínicos das anteras dos estames (DAMIÃO FILHO, 2005). A polínia é uma massa cerosa constituída por grãos de pólen e uma substância viscosa e transparente, presente nos estames de algumas flores, principalmente nas orquídeas (GONÇALVES; LORENZI, 2011).

A polinização é caracterizada pelo transporte de células reprodutivas masculinas, através dos grãos de pólen que estão localizados nas anteras de uma flor, para o receptor feminino (estigma) de outra flor (da mesma espécie), ou para o seu próprio estigma (SOUZA; FLORES; LORENZI, 2013).

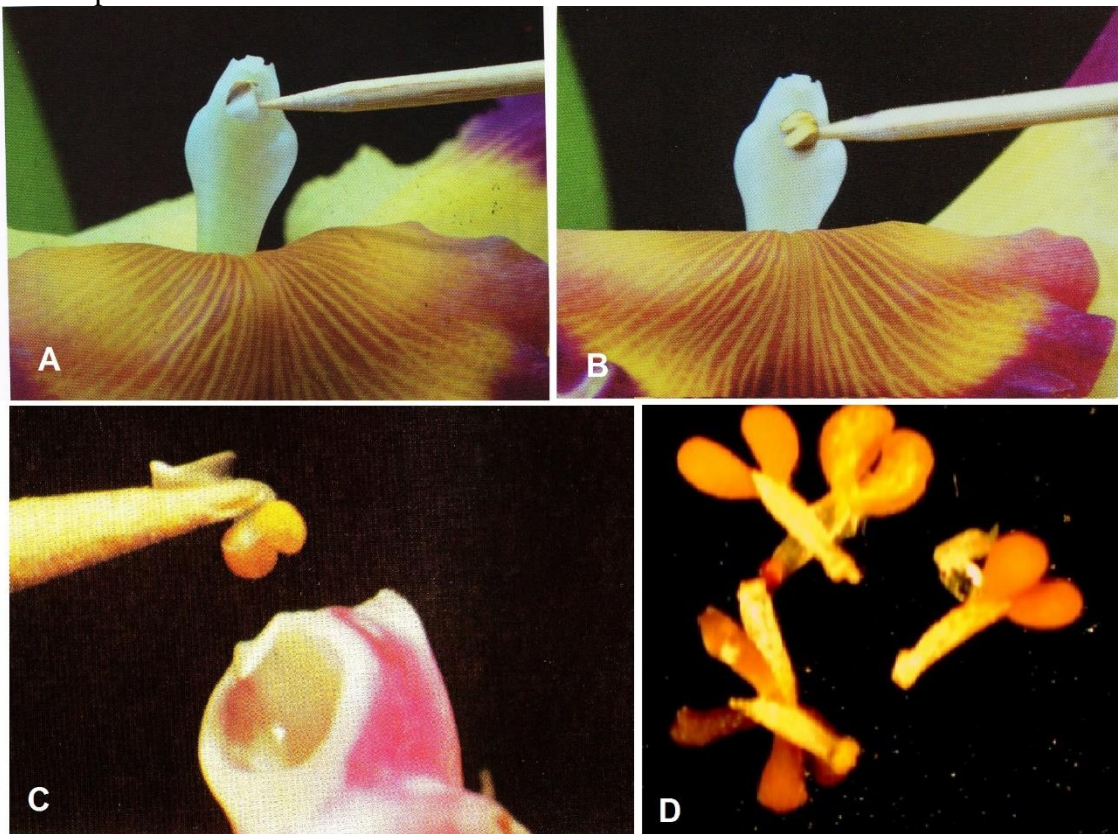
É possível reproduzir orquídeas a partir de polinização controlada, gerando híbridos interespecíficos e intergenéricos. Até o início deste século havia 120.000 híbridos registrados, produtos dos cruzamentos (WATANABE et al., 2002). Além dos cruzamentos entre espécies ou gêneros distintos, autopolinização pode ser feita gerando, muitas vezes, uma progênie muito semelhante, porém não idêntica à planta-mãe.

Apesar de ser uma técnica relativamente fácil, principalmente quando se deseja cruzar espécies que apresentam flores, existem alguns problemas que podem dificultar

o processo, tais como: épocas de florescimento distintas entre as espécies que se pretende cruzar; barreira da incompatibilidade genética entre as plantas, levando a não formação de cápsulas ou com sementes estéreis; assim como a produção de plantas malformadas. Estes são problemas que serão detectados cerca de quatro a oito anos depois, quando as plantas emitirem a primeira floração (FARIA; ASSIS; CARVALHO, 2010).

Quando se pretende fazer a polinização entre plantas que florescem em épocas distintas, as políneas (Figura 7) doadoras podem ser coletadas e armazenadas em envelopes, porém essa metodologia deve ser utilizada para armazenar em um curto espaço de tempo. Diferentemente, a criopreservação é empregada no armazenamento de pólen e mostra-se método eficiente na conservação por longos períodos sem perder a viabilidade.

Figura 7: Polínea de orquídea: A – opérculo com as políneas; B – retirada do opérculo com as políneas; C – polínea sendo introduzida no estigma; D – Foto da polínea em lupa estereoscópica.



Fonte: A, B - Faria (2016); C - Campos (2002); D – o próprio autor.

2.7. CÁPSULAS E SEMENTES

Apesar da existência de um grande número de espécies de orquídeas, o cruzamento entre plantas de uma mesma espécie (cruzamento intraespecífico) é o fenômeno mais comum na natureza. Existem três mecanismos principais que contribuem para este tipo de cruzamento, garantindo o isolamento reprodutivo entre espécies (FARIA; ASSIS; CARVALHO, 2010).

Faria et al. (2010), descrevem que o primeiro mecanismo consiste na adaptação de cada tipo de orquídea a polinizadores específicos, o que impede, de um modo geral, o cruzamento entre espécies distintas. O segundo mecanismo que evita o cruzamento entre espécies diferentes de plantas geograficamente próximas refere-se às épocas distintas de floração. Além dos dois mecanismos, pode ainda se atribuir à incompatibilidade genética entre plantas como uma terceira condição para isolamento delas. Em alguns casos, a incompatibilidade genética permite a fecundação de uma espécie por outra, mas quando isso ocorre, geralmente produzem sementes inférteis ou as flores fecundadas são abortadas.

Na maioria das orquídeas, após a polinização, o estigma fecha, a flor murcha e seca, e o ovário inicia a formação da cápsula. O tempo necessário para o desenvolvimento e amadurecimento da cápsula depende da espécie, variando de 90 a 360 dias (Figura 8). O primeiro sintoma de que as sementes atingiram a maturidade e a cápsula está prestes a abrir geralmente ocorre quando a haste floral se apresenta murcha e com coloração amarelada (CAMPOS, 2001).

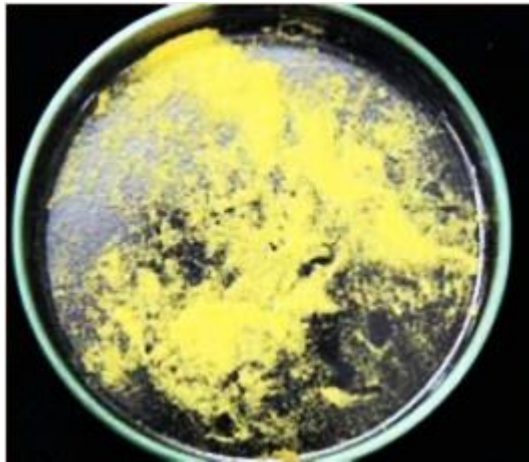
Figura 8: Cápsula madura de *Oncidium baueri* Lindl.



Fonte: o próprio autor

Cada cápsula pode conter entre mil e mais de um milhão de sementes, dependendo do tamanho do fruto. As sementes pequenas se enquadram entre as de menor tamanho nas fanerógamas, são desprovidas de endosperma e apresentam alta capacidade de dispersão (FARIA; ASSIS; CARVALHO, 2010; FARIA et al., 2012). Segundo Campos (2002), as sementes de orquídeas não são encontradas à venda, porém podem ser obtidas por polinização artificial de flores (Figura 9)

Figura 9: Sementes da orquídea *Oncidium baueri* Lindl. extraídas de um único fruto.



Fonte: Ferrari, (2016).

Apesar da quantidade e da facilidade de dispersão na natureza, poucas sementes germinam, uma vez que elas são constituídas basicamente pelo embrião, não possuindo substâncias nutritivas de reserva necessária para iniciar a germinação, sendo necessária uma fonte externa de energia para que possam germinar.

Segundo Faria et al. (2012), na natureza, para que a germinação e o desenvolvimento em plântula de orquídeas ocorram é necessária a presença de micorrizas que irão desempenhar o papel de nutrir inicialmente. Os mesmos autores destacam ainda que, atualmente, a obtenção de orquídeas por sementes é um processo fácil e eficiente, capaz de multiplicar com sucesso um grande número de espécies de maneira uniforme e rápida, através da chamada cultura assimbiótica, utilizando meio de cultura contendo nutrientes que dão condição à germinação e crescimento (Figura 10).

Figura 10: Crescimento *in vitro* de orquídeas *Cattleya walkeriana* em meio de cultura.



Fonte: o próprio autor.

O comércio de orquídeas nativas tem tido como prática o extrativismo que, aliado à destruição de seus habitats naturais pelo avanço da agropecuária, levou à extinção ou à quase extinção de muitas espécies. A extinção eminente de várias espécies não depende somente da crescente exploração, mas também se deve à lenta multiplicação por vias naturais de propagação (JUNGHANS; SOUZA, 2009). Por isso, a germinação de sementes de orquídeas *in vitro*, em meio de cultura asséptica, vem sendo realizada desde o início do século passado (KNUDSON, 1922).

A produção de orquídeas *in vitro* é uma técnica relevante do ponto de vista comercial e ecológico, pois, as plantas produzidas podem ser utilizadas em programas de reintrodução de espécies nativas em áreas de preservação ambiental devido à variabilidade genética gerada pelo explante e também para comercialização (MARTINI et al., 2001).

Vendrame et al. (2014), afirmam que os bancos de sementes têm se mostrado uma opção para preservação *ex situ*, entretanto o sucesso depende do conhecimento sobre o comportamento das espécies quando submetidas à redução do grau de umidade e ao armazenamento em temperaturas baixas.

Testes de viabilidade das sementes armazenadas, como a germinação *in vitro* e o teste de tetrazólio são indispensáveis para avaliar a qualidade do banco de sementes. Machado Neto e Custódio (2005) descrevem que as vantagens destes bancos se aplicam ao fato de manter sementes de inúmeras espécies em um pequeno espaço físico, com capacidade de germinar e originar novas plantas. Além disso, a diversidade biológica do material é mantida com a utilização de sementes como fonte de explantes.

2.8. SEMENTES ORTODOXAS E RECALCITRANTES

As sementes são classificadas em ortodoxas, recalcitrantes ou intermediárias, baseada na maior ou menor tolerância à dessecação. São classificadas como ortodoxas as que mantêm por mais tempo a qualidade fisiológica após dessecação, até um grau de umidade em torno de 5%, e ser armazenadas sob baixas temperaturas por um longo período (NERY et al., 2014).

Sementes sensíveis à dessecação, que não sobrevivem em baixos níveis de umidade, o que, conseqüentemente, impede o seu armazenamento por longo prazo, são classificadas como recalcitrantes (ROBERTS, 1973). Estas sementes apresentam metabolismo intenso durante o seu desenvolvimento e etapas pós-colheita (BARBEDO; MARCOS FILHO, 1998; CASTRO; BRADFORD; HILHORST, 2004).

Além destes dois grupos existe um terceiro, em que as sementes apresentam um comportamento de armazenamento intermediário ao ortodoxo e ao recalcitrante. Esse grupo tolera a desidratação de 7,0% a 10% de umidade e não aceitam baixas temperaturas durante períodos de tempo prolongados. Portanto, a classificação das sementes quanto à capacidade de armazenamento depende de estudos de tolerância à dessecação e do armazenamento sob temperaturas baixas (HONG; ELLIS, 1996).

As sementes de orquídeas expressam comportamento semelhante aos das sementes ortodoxas, possuem baixa umidade e suportam o armazenamento em baixas temperaturas, incluindo a criopreservação em nitrogênio líquido à uma temperatura de -196°C.

2.9. VIABILIDADE DAS SEMENTES

Em trabalhos com armazenamento de sementes, o emprego de testes rápidos para a avaliação da qualidade fisiológica é de grande importância para garantir a eficiência do processo. O teste com sal de tetrazólio é o mais comumente utilizado, pois permite a determinação rápida da viabilidade de sementes, principalmente, daquelas que apresentam dormência, as recalcitrantes e as que germinam lentamente (BRASIL, 2009).

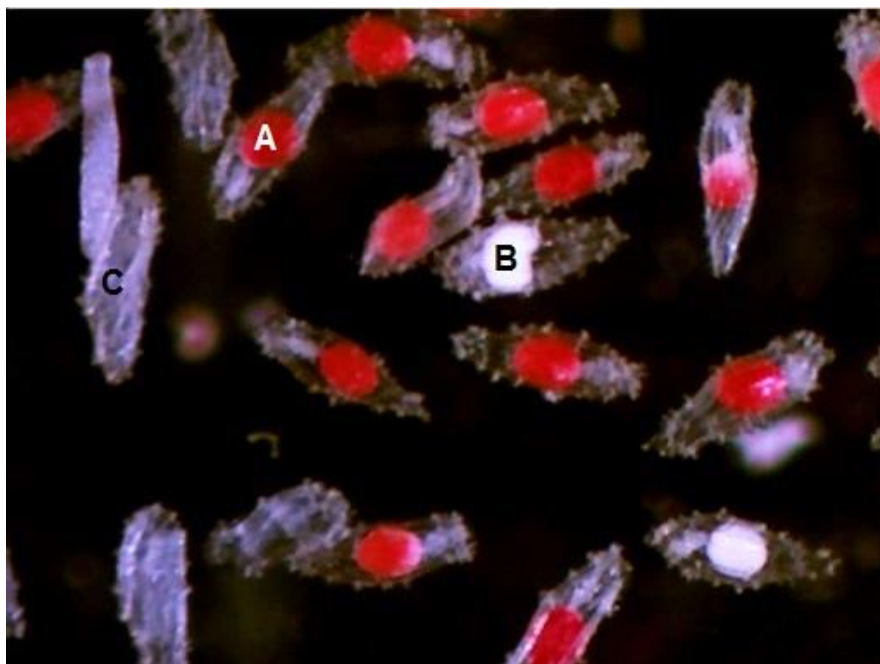
O tetrazólio é definido como um teste bioquímico, que avalia a atividade das enzimas desidrogenases envolvidas no processo de respiração celular, que pode ser usado quando as sementes necessitam ser semeadas logo após a colheita; quando apresentam

dormência ou para resolver problemas encontrados no teste de germinação, como por exemplo, presença de um grande número de plântulas anormais. Também pode ser usado para avaliar o vigor, determinar a viabilidade das sementes após tratamentos pré-germinativos, danos por secagem, por insetos e por umidade, bem como, para detectar danos mecânicos de colheita e beneficiamento (BRASIL, 2009).

A hidrogenação do sal de tetrazólio (cloreto de 2, 3, 5-trifenil tetrazólio) produz nas células vivas do embrião uma substância vermelha estável e não difusível, o trifênil formazan (PIÑA-RODRIGUES; FIGLIOLIA; PEIXOTO, 2004), o qual permite diferenciar as partes vivas, coloridas de vermelho, daquelas mortas, que mantêm a sua cor original (HOSOMI, 2009).

Em orquídeas o teste é realizado embebendo as sementes previamente em água destilada durante 24 horas, em seguida são imersas em solução aquosa (1%) de sal de tetrazólio (cloreto de 2,3,5 trifênil tetrazólio) e mantidas na ausência de luz a 30°C, durante 24 horas (SINGH, 1981; JORDÃO et al., 1988). A contagem é realizada ao microscópio estereoscópico, considerando-se viáveis as sementes portadoras de embriões coloridos de vermelho como visto na Figura 11 (LAUZER; ST-ARNAUD; BARABÉ, 1994).

Figura 11: Foto em lupa estereoscópica de sementes da orquídea *Catasetum atratum* submetidas a teste de tetrazólio (A) – semente com embrião viável; (B) – semente com embrião inviável; (C) – sementes vazias.



Fonte: o próprio autor.

2.10. CRIOPRESERVAÇÃO

A criopreservação é um método de conservação de material biológico em temperaturas extremamente baixas, de até -196°C em nitrogênio líquido (NL) ou em sua fase de vapor a -150°C , com a manutenção das características originais do material após o descongelamento (SANTOS, 2000).

A crioestocagem de sementes em nitrogênio líquido (NL) foi inicialmente desenvolvida para a conservação de recursos genéticos de espécies de importância agrícola. Porém, nos últimos anos, essa tecnologia tem conquistado grande destaque na preservação de espécies vegetais ameaçadas de extinção, como a criopreservação de sementes e outras partes como embriões, pólen, tecidos e células. A chave para o sucesso da criopreservação envolve a necessidade de um controle rigoroso dos procedimentos para a desidratação, permeabilidade crioprotetora e a prevenção de injúrias causadas pelo estresse osmótico e toxicidade dos componentes químicos das soluções crioprotetoras durante a desidratação (GALDIANO JUNIOR, 2013).

Uma vez obtida a temperatura do NL, as amostras criopreservadas poderão ser mantidas por período indefinido. Os protocolos disponíveis na literatura com variados tipos de plantas contrastam em relação ao tempo de estocagem em NL, tendo sido encontrado períodos entre 30 min até dois meses armazenados para fins experimentais. Contudo, a manutenção dos criotubos durante o período de 30 min, seis meses ou um ano inteiro em NL não modificou a capacidade de germinação de sementes da orquídea *Phaius thankervilleae* (HIRANO et al., 2009).

Essa técnica de preservação é comumente utilizada para o armazenamento de esperma que são utilizados para inseminação artificial e fertilização *in vitro* e embriões humanos e animais. Utilizada também para o armazenamento de eritrócitos e para conservação da diversidade microbiana. Segundo Bajaj (1995), é possível conservar por um longo período diferentes materiais vegetais de forma que por outros métodos não seria possível, dentre eles estão: pólen, sementes, embriões, raízes, bulbos, gemas e meristemas.

A criopreservação em nitrogênio líquido é um método potencialmente estudado para reduzir a taxa de deterioração, aumentando assim o tempo de armazenamento das sementes, assegurando a preservação das fontes genéticas da planta, além de reduzir os custos e a perda da viabilidade (STANWOOD; BASS, 1981; STANWOOD, 1985). Vieira (2000) ressalta que as vantagens desse método em relação à conservação *in vitro* são: maior tempo de conservação, menores riscos de perda do material e menor custo para manutenção.

Uma diminuição do conteúdo de água das células e tecidos é necessária antes da criopreservação. A maioria das células ou explantes contêm quantidades elevadas de água, o que provoca danos mecânicos às células, devido à formação de cristais de gelo intra e extracelular durante o congelamento (FABIÁN et al. 2008; ENGELMANN, 2011).

Benson et al. (2008) e Simione (2013) descrevem que o processo de congelamento e descongelamento afeta estruturas, integridades coligativa e osmótica das células, o que resulta em rupturas físicas e injúrias mecânicas letais. Esse é o ponto crítico da criopreservação. Basicamente, existem dois tipos de injúrias decorrentes do processo de congelamento em nitrogênio que devem ser evitadas a fim alcançar sucesso na criopreservação: formação de gelo intracelular e cristalização de gelo extracelular (DAY et al. 2008).

Os protocolos devem abranger os procedimentos de coleta e desinfecção das sementes, técnicas de desidratação e teores de água ideais para cada espécie, formas de proteger as células contra injúrias, técnicas de congelamento e descongelamento, germinação das sementes até a aclimatização e produção das mudas. Em vista disso, o uso de crioprotetores se faz necessário para a proteção de estruturas celulares, principalmente das membranas, a fim de se obter êxito ao final do processo de criogenia.

2.10.1. Histórico

A criobiologia é utilizada desde 2500 a.C. no Egito pela Medicina e o uso das baixas temperaturas foi recomendado por Hipócrates para estancar hemorragias e inchaços (BARBOSA; SANVITTO, 1973). Com o início da ciência moderna, Robert Boyle estudou os efeitos das baixas temperaturas em animais, mostrando que o frio evitava a putrefação dos tecidos (BATISTA, 2006).

Em 1949, pela primeira vez foi criopreservado sêmen de touro (POLGE; SMITH; PARKERS, 1949). Este fato levou a um amplo uso da criopreservação em vários tipos de órgãos, tecidos e células. Suspensões celulares, de sêmen e sangue e secções finas de tecidos podem, em alguns casos, ser armazenadas quase indefinidamente em nitrogênio líquido.

A descoberta acidental da ação crioprotetora do glicerol por Polge, Smith e Parkers (1949) durante seus ensaios para conservar espermatozoides de aves revolucionou os métodos de criopreservação de diversas células e tecidos. Smith (1950) estendeu as

observações da função desse agente para a criopreservação de hemácias usando como crioprotetor o glicerol a -80°C e usando gelo seco e álcool (VALERI; RAGNO, 2005). Esses relatos foram fundamentais para identificar elementos-chaves que desempenhariam um papel crucial na evolução do campo bioconservação.

Entretanto, a criopreservação vegetal progrediu vagarosamente se comparada com os trabalhos envolvendo tecidos animais, principalmente de mamíferos, pois somente após dez anos, Sakai (1960) relatou a sobrevivência de tecidos vegetais quanto expostos a temperaturas ultrabaixas, por meio de ensaios com brotos de amoreira desidratados imersos em nitrogênio líquido ele demonstrou a viabilidade do tecido vegetal após o descongelamento.

Na década de 1970 foram feitos estudos que comprovaram que o dimetilsulfóxido (DMSO) atuava também como protetor das células, reduzindo as injúrias causadas pelo congelamento. Em 1971, Latta publicou o primeiro protocolo de criopreservação vegetal, utilizando o que foi chamado posteriormente de métodos clássicos através de congelamento lento, seguido de imersão rápida em nitrogênio líquido e aplicando soluções crioprotetoras que predominaram até meados da década de 1980 (SILVEIRA, 2015).

Na busca de maior eficiência na proteção das células durante o congelamento, Fahy et al. (1984) desenvolveram os chamados métodos contemporâneos de criopreservação que se baseiam na vitrificação, ou seja, na transformação de uma solução aquosa num líquido amorfo com aspecto vítreo devido a um congelamento muito rápido, evitando a formação dos cristais de gelo que causam injúrias às membranas celulares.

Já na década de 1990, Dereuddre et al. (1990) descreveram pela primeira vez os métodos do encapsulamento em alginato de cálcio e Dumet et al. (1993) a desidratação em sílica gel. Em 2011, foi publicado o primeiro trabalho que constatou a eficiência do floroglucinol como aditivo crioprotetor de protocormos de orquídeas (VENDRAME; FARIA, 2011).

2.10.2. Crioprotetores

Um dos problemas enfrentado durante o processo de criopreservação são os danos sofridos pelas células, mais especificamente pelas membranas celulares, devido à desidratação e ao aumento da concentração de soluto além da formação de cristais de gelo que causam o rompimento destas membranas e, conseqüentemente, a morte da célula. Silveira

(2015) enfatiza que o descongelamento também deve ser conduzido de forma criteriosa evitando-se ao máximo as condições para a formação dos cristais no interior celular. Processos inadequados de descongelamento causam na maioria das vezes danos às células e aos tecidos criopreservados.

O processo de congelamento de explantes envolve fenômenos complexos, não sendo completamente compreendido pela ciência. As taxas de sobrevivência de explantes após o congelamento estão vinculadas principalmente à fisiologia, teor de água nas células e ao uso de crioprotetores (BENSON et al., 2008).

Em vista disso, o uso de crioprotetores se faz necessário para a proteção de estruturas celulares, principalmente as membranas, a fim de se obter êxito ao final do processo de criogenia (VIEIRA, 2013). Mazur (1980) classifica os crioprotetores como penetrantes (intracelulares) e não penetrantes (extracelulares).

Os crioprotetores intracelulares são solutos orgânicos responsáveis por proteger as organelas das células durante o resfriamento. São moléculas com baixo peso molecular e desta maneira podem atravessar as membranas celulares com relativa facilidade. Dalimata e Graham (1997) descrevem o mecanismo de ação destes crioprotetores que são baseados em estruturas que promovem ligações de hidrogênio com as moléculas da água. Estas ligações mudam a orientação da molécula da água nos cristais de gelo, criando um ambiente menos nocivo para as células. Os mais comumente utilizados são o etilenoglicol, propilenoglicol, dimetilsulfóxido (DMSO), glicerol, metanol e etanol (NEVES, 2008).

O mecanismo de ação dos agentes crioprotetores não penetrantes baseia-se na proteção das células contra os efeitos osmóticos durante o processo de congelamento, promovendo um meio hipertônico que induz a saída de água das células levando a desidratação, ou seja, eles agem no meio extracelular, reduzindo assim a possibilidade da formação de cristais de gelo intracelular. Os crioprotetores extracelulares são as macromoléculas e açúcares, proteínas, lipídios e alguns aminoácidos, cuja as funções são reduzir a formação de gelo, permitir a desidratação das células e proteger a membrana celular, possuir alto peso molecular não podem penetrar as células. Os mais utilizados são a sacarose, glicose, lactose, trehalose, polivinilpirrolidona (PVP) e manitol (NIEMANN, 1991; DENNISTON; MICHEKET; GODKE, 2000).

Os crioprotetores em altas concentrações podem causar toxicidade as células ocasionando danos irreversíveis. No entanto, os efeitos da toxicidade podem ser minimizados através da exposição breve aos crioprotetores ou através de resfriamento rápido (VAJTA;

HOLM; KUWAYAMA, 1998). As rápidas taxas de resfriamento podem diminuir as injúrias celulares através da passagem direta pela zona perigosa de resfriamento que está entre + 15°C e - 5°C (MARTINO; POLLARD, LEIBO, 1996).

Diversos métodos vêm sendo utilizados para minimizar os danos osmóticos e tóxicos como a aplicação de crioprotetores menos tóxicos, e também a utilização combinada de dois ou três crioprotetores. O desempenho dos agentes crioprotetores intracelulares (metanol, DMSO, glicerol, etilenoglicol) pode ser otimizado associando-se os crioprotetores de ação extracelular (glicose, sacarose, trehalose) (DENNISTON; MICHEKET; GODKE, 2000).

Os crioprotetores são utilizados para prevenir a formação de cristais de gelo durante o congelamento sendo mais comumente utilizadas metanol, dimetilsulfóxido (DMSO), glicerol, etilenoglicol e sacarose. No que se refere a toxicidade todos são retratados como moderadamente tóxicos. Todavia, a toxicidade dos crioprotetores limita a concentração em que eles podem ser usados e isso reduz a eficiência da crioproteção destes agentes (SILVEIRA, 2015).

2.10.3. Métodos para a criopreservação vegetal

A tolerância a temperaturas ultrabaixas e à desidratação dos tecidos vegetais influenciará diretamente na sobrevivência, sendo importante conhecer os mecanismos bioquímicos e biofísicos que são responsáveis dos tecidos à desidratação (STUSHNOFF; SEUFFERHELD, 1995).

Withers e Willians (1998) dividem os métodos de criopreservação em etapas como: pré-crescimento, crioproteção, resfriamento, armazenamento, aquecimento e crescimento de recuperação. Na fase de crescimento, são aplicados compostos com atividade osmótica ou outros aditivos para melhorar a tolerância ao congelamento. A crioproteção é uma alternativa para minimizar as mudanças físicas e químicas que ocorrem durante o congelamento e descongelamento.

O resfriamento dos materiais biológicos pode ser feito de acordo com diferentes metodologias, como a clássica (congelamento lento) ou a contemporânea (vitrificação, encapsulamento-desidratação).

A desidratação do material é uma etapa importante para o sucesso do

protocolo, pois se o material apresentar elevado grau de umidade, acima de 10%, pode ocorrer a formação dos cristais de gelo causando injúrias nos tecidos. Obtém-se a desidratação por meio de exposição a sílica gel, a câmara de fluxo laminar ou a soluções crioprotetoras. O tempo de exposição varia do material vegetal a ser trabalhado (SANTOS; SALOMÃO, 2010).

2.10.3.1. Metodologia Clássica

Dentre os primeiros métodos de criopreservação desenvolvidos encontra-se o congelamento lento, no qual são realizados o resfriamento e o congelamento do material vegetal de forma gradual até atingir temperatura em torno de -40°C a uma velocidade de 1 a $10^{\circ}\text{C hora}^{-1}$, utilizando um congelador programável e, na sequência, a imersão direta em nitrogênio líquido (ENGELMANN, 1997).

Nesse método, há a formação de gelo no meio externo enquanto o meio intracelular fica em estado de super-resfriamento, mas não ocorre o congelamento. Se este processo ocorrer de forma lenta, há perda de água, pois a pressão de vapor da água excede aquela do exterior congelado e, com a progressiva redução da temperatura, a água se difunde do interior das células para a solução extracelular e é convertida em gelo na superfície ou entre o protoplasto e a parede, ocorrendo aí o processo chamado de desidratação induzida por congelamento. Evita-se assim a formação de gelo em seu interior. Quando o potencial hídrico das células parcialmente desidratadas se iguala àquele do gelo extracelular, um equilíbrio é estabelecido e desidratação adicional não ocorrerá, contanto que a temperatura permaneça constante (SANTOS, 2000).

Se o congelamento ocorrer rapidamente, a desidratação por congelamento não ocorre e os cristais de gelo são formados no interior das células, causando injúrias ou até a morte delas. Após o descongelamento, as células intactas podem reabsorver água e ganhar turgor novamente (SAKAI; LARCHER, 1987)

2.10.3.2. Metodologia Contemporânea

A vitrificação é a técnica mais utilizada para criopreservação de explantes por ser fácil de conduzir, não requerer o uso de equipamentos programáveis ou ultrafreezers, mas acima de tudo, por apresentar alta porcentagem de restabelecimento (FERRARI, 2016).

Segundo Souza (2015), a vitrificação é um método de criopreservação que consiste em desidratar o material vegetal por intermédio de uma solução altamente concentrada, sendo a solução vitrificante mais utilizada a PVS2, Solução de Vitrificação de Plantas (Plant Vitrification Solution 2), descrita por Sakai, Kobayashi, e Oiyama (1990). Originalmente composta de 30% de glicerol, 15% de etileno glicol, 15% DMSO e 0,15 mol L⁻¹ de sacarose, posteriormente foi modificada e com a concentração de 0,4 mol L⁻¹ de sacarose (NISHIZAWA et al., 1993). O processo de recuperação do material baseia-se no descongelamento rápido que ocorre em banho-maria à 40°C, em seguida a remoção dos crioprotetores e cultivo em meio de cultura (VENDRAME et al., 2014). É uma técnica simples e efetiva, de baixo custo e aplicável a um amplo espectro de explantes de orquídeas (GALDIANO JÚNIOR, 2013).

A vitrificação é obtida através da desidratação dos tecidos com soluções crioprotetoras até atingir um grau de umidade onde não haja água livre para a formação de cristais de gelo. Após o tratamento com os crioprotetores, o material vegetal é imerso em nitrogênio líquido e congelado.

2.11. CRIOPRESERVAÇÃO DE ORQUÍDEAS

Para a criopreservação de *Orchidaceae*, tem-se utilizado diferentes órgãos vegetais: embriões zigóticos, sementes, sementes imaturas, protocormos, pólen, sementes e suspensão de células (VENDRAME et al., 2014). Os embriões e protocormos regeneram-se facilmente originando uma nova planta (ISHIKAWA et al. 1997).

O armazenamento de germoplasma exerce um papel de grande importância para a conservação de sementes de orquídeas a longo prazo, pois requer pequeno espaço para armazenamento e permite a preservação, é de fácil distribuição de germoplasma a custos reduzidos (PRITCHARD; POYNTER; SEATON, 1999) e representa uma importante ferramenta para programas de melhoramento de sementes híbridas (VENDRAME et al., 2007).

Ainda que alguns pesquisadores tenham demonstrado que sementes de várias espécies de orquídeas mantêm a viabilidade quando armazenadas pelos procedimentos convencionais, a longevidade e os resultados obtidos são bastante variáveis. Assim sendo, o armazenamento de sementes de orquídeas pelo método tradicional (-18°C e 5% de umidade)

parece não ser o mais indicado para a conservação por longos períodos em bancos de germoplasma.

Diversos trabalhos vêm sendo desenvolvidos ao longo dos últimos anos no sentido de se determinar quais as melhores condições de armazenamento de sementes de orquídeas. Os resultados são muito variáveis, dependendo do método empregado, da espécie e, até mesmo, do lote de sementes testado.

Bowling e Thompson (1972) armazenaram sementes de 30 diferentes espécies de orquídeas a -10°C . Embora essas sementes permanecessem viáveis durante três anos, uma análise após 10 anos de armazenamento revelou que todas as sementes estavam mortas. Pritchard (1984) criopreservando sementes de orquídeas na década de 80 verificou que dez diferentes espécies resistiram satisfatoriamente ao processo de criopreservação, mantendo a viabilidade inicial após o processo. Seaton e Hailes (1989) verificaram a perda quase total da viabilidade em um lote de sementes de *Cattleya aurantiaca* armazenadas durante 50 dias a -18°C , enquanto que em outro lote dessa mesma espécie, as sementes armazenadas durante 400 dias nas mesmas condições, apresentaram viabilidade.

No estudo da criopreservação de sementes de *Dendrobium* híbrido expostas aos crioprotetores floroglucinol e Supercool X1000, Galdiano Júnior et al. (2012) observaram que floroglucinol 1% viabilizou alta germinação *in vitro* das sementes (79%), sendo eficaz como crioprotetor para criopreservação de sementes *Dendrobium* híbrido com o método vitrificação, enquanto que a adição de Supercool X1000® 1% reduziu a taxa de germinação das sementes. Os autores relataram que as sementes foram germinadas e as plântulas produzidas apresentaram crescimento e desenvolvimento normais, sem alterações.

Sementes imaturas de *Cyrtopodium hatschbachii* Pabst (Orchidaceae) foram criopreservadas por uma técnica de encapsulação – desidratação sendo observado aumento na germinação e significativa sobrevivência das sementes em 64% com desenvolvimento das plantas aclimatizadas após serem criopreservadas (SURENCISKI et al., 2012).

Pode-se verificar que essa é uma área relativamente nova e em pleno desenvolvimento, o que, segundo Pritchard, Poynter e Seaton (1999), gera bastante discussão e requer ainda muita pesquisa.

Um método para conservar parte da diversidade genética de uma forma acessível é a conservação de polínea. O armazenamento de polínea é semelhante ao de sementes, embora o teor de água neste caso, seja mais fácil de ser ajustado. Carvalho (2006) ressalta que a qualidade de políneas coletadas é importante para o sucesso do protocolo de

criopreservação. Políneas coletadas de anteras muito novas ou muito velhas não sobrevivem ao armazenamento.

Estudos sobre o armazenamento de pólen de orquídeas ainda são escassos. Examinando pólen de diversas orquídeas terrestres, vários autores concluíram que, para as espécies estudadas, a desidratação em sílica-gel, apresentou queda em sua viabilidade (MEEYOT; KAMEMOTO, 1969; SEATON; HAILES, 1989; SEATON; PRITCHARD, 1999).

A criopreservação em nitrogênio líquido é recomendada para formação dos bancos de germoplasma de Orchidaceae, entretanto, é indispensável salientar a importância de comprovar a eficiência de cada protocolo, pois cada espécie e cada órgão da planta possuem particularidades que devem ser levadas em consideração na hora do armazenamento em temperaturas ultrabaixas.

3. ARTIGOS

3.1. SOLUÇÕES CRIOPROTETORAS NA CRIOPRESERVAÇÃO DE SEMENTES DA ORQUÍDEA BRASILEIRA EM RISCO DE EXTINÇÃO *Catasetum atratum* Lindl.

3.1.1. Resumo

A orquídea *Catasetum atratum* é uma espécie de ocorrência em ambientes de Cerrado e Mata Atlântica, consideradas áreas de hotspot. As ameaças decorrentes do risco de coleta indiscriminada devido ao seu valor medicinal poderão levar a espécie a uma categoria de ameaça em um futuro próximo. A criotecnologia ganhou espaço nos últimos anos na conservação e preservação de espécies vegetais ameaçadas de extinção, seja através da criopreservação de sementes ou suas partes como: embriões, pólen, tecidos e células. O objetivo do presente trabalho foi avaliar diferentes crioprotetores na criopreservação em nitrogênio líquido de sementes da orquídea brasileira em extinção *Catasetum atratum*. Os tratamentos constuíram de dois tratamentos controle: C0 – controle sem imersão em solução crioprotetora e sem nitrogênio líquido e C1 - sem solução crioprotetora e com nitrogênio líquido; os demais tratamentos com soluções crioprotetoras foram: glicerol, sacarose, PVS2 e floroglucinol isoladas e combinadas. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com dois controles 11 tratamentos e 10 repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5%. As sementes apresentavam porcentagem inicial de $69,7 \pm 3,30\%$ de embriões viáveis. As sementes dos tratamentos T4, T6 e T9 foram as que apresentaram maior viabilidade após a criopreservação: 67,7%, 66,1% e 69,8%, respectivamente. Para sobrevivência de protocormos destacaram-se T4 e T9 com 62,0% (PVS2) e 65,4% (sacarose+1% de floroglucinol). A solução de PVS2 isolada foi a que proporcionou maior sobrevivência das sementes e germinação de plântulas sem anomalia (67,7%) de *C. atratum*.

Palavras-chave: Conservação, nitrogênio líquido, Orchidaceae, vitrificação.

CRYOPROTECTANT SOLUTIONS IN THE CRYOPRESERVATION OF THE BRAZILIAN ORCHID AT RISK OF EXTINCTION *Catasetum atratum* Lindl.

Abstract

The orchid *Catasetum atratum* is a species of occurrence in environments of Cerrado and Atlantic Forest, considered areas of hotspot. Threats resulting from the risk of indiscriminate collection due to their medicinal value may lead to a threat to the species in the near future. Cryotechnology has gained space in recent years for the conservation and preservation of endangered plant species, either through cryopreservation of seeds or their parts such as: embryos, pollen, tissues and cells. The aim of the present work was to evaluate different

cryoprotectants in the liquid nitrogen cryopreservation of seeds of the endangered Brazilian orchid *Catasetum atratum*. The treatments consisted of two control treatments: C0 - control without immersion in cryoprotectant solution and without liquid nitrogen and C1 - without cryoprotectant solution and with liquid nitrogen; The other treatments with cyroprotective solutions were: glycerol, sucrose, PVS2 and floroglucinol isolated and combined. The experimental design was the completely randomized with two controls 11 treatments and 10 replicates. The data were submitted to analysis of variance and the means were compared by the Tukey test at 5%. The seeds had an initial percentage of $69.7 \pm 3.30\%$ of viable embryos. The seeds of the treatments T4, T6 and T9 were the ones that presented the greatest viability after cryopreservation: 67.7%, 66.1% and 69.8%, respectively. For the survival of protocorms, T4 and T9 were highlighted with 62.0% (PVS2) and 65.4% (sucrose + 1% floroglucinol). The isolated PVS2 solution provided the highest seed survival and seedling germination without anomaly (67.7%) of *C. atratum*.

Keywords: Conservation, liquid nitrogen, Orchidaceae, vitrification.

3.1.2. Introdução

A subtribo Catasetinae é exclusiva das Américas. Sua distribuição ocorre do México ao norte da Argentina e Bolívia, com grande maioria das espécies representadas na América do Sul (FARIA et al., 2016). O maior centro de ocorrência desse gênero é o Brasil, com 103 espécies válidas (BARROS et al., 2015). Os Catasetuns podem ser epífitas, em sua maioria, ou terrícolas ou rupícolas (HOLST, 1999). A espécie *Catasetum atratum* Lindley (Figura 12) é uma espécie ocorrente em ambientes de Cerrado e Mata Atlântica, nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul.

Segundo Faria et al. (2016), *C. atratum* possuem floração precoce, inflorescências eretas na base e arqueadas no terço superior. Flores cerosas, distribuídas, no terço superior. Antenas eretas, paralelas de tamanho médio, atingindo o fundo do saco do labelo. Sépalas côncavas, lanceoladas, verdes com densa e minúsculas máculas vermelho-escuras. Pétalas côncavas, lanceoladas, verdes com grandes máculas mais notáveis vermelho-escuras. Labelo súpero, em forma de capacete, trilobado, ápice voltado para trás, margens dos lóbulos laterais e lóbulos medianos com minúsculas franjas. O ápice e o lado interior da cavidade são esbranquiçados.

Essa espécie possui uma grande extensão de ocorrência, porém as ameaças decorrentes do risco de coleta indiscriminada devido ao seu valor ornamental e medicinal poderão levar a espécie a uma categoria de ameaça em um futuro próximo. O Conselho Nacional de Conservação da Flora - CNCFlora (2016) classifica esta espécie em quase

ameaçada de extinção (NT): espécies que no momento não se qualificam como ameaçadas, mas estão perto ou suscetíveis de serem qualificadas em uma categoria de ameaça num futuro próximo.

A destruição contínua dos habitats naturais deste gênero põe em risco sua existência, justificando-se desta forma estudos mais detalhados da conservação e crioconservação sobre *C. atratum*, contribuindo assim para a elucidação destas questões. Portanto, quanto maior o número de informações disponíveis sobre o gênero e suas espécies, maiores serão as chances de sua preservação em um futuro próximo caso haja necessidade de reintroduzi-las em seus habitats naturais, com a obtenção de grandes porcentagens de êxito. Desta forma, a criotecnologia se mostra como um caminho viável para conservação desse germoplasma.

Galdiano Júnior (2013) relata que a crioestocagem de sementes em nitrogênio líquido (NL) foi inicialmente desenvolvida para a conservação de recursos genéticos de espécies de importância agrícola. Porém, nos últimos anos, essa tecnologia tem conquistado grande destaque na preservação de espécies vegetais ameaçadas de extinção, com a criopreservação de sementes e outras partes como embriões, pólen, tecidos e células.

A criopreservação tem como princípio básico a redução da temperatura com a finalidade de desacelerar o metabolismo celular, permitindo que sementes e tecidos sejam conservados por períodos indeterminados, o que possibilita a retomada do desenvolvimento celular normal após o armazenamento em nitrogênio líquido a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ (PEGG, 2007).

A chave para uma criopreservação com sucesso envolve a necessidade de um controle rigoroso dos procedimentos para a desidratação, permeabilidade crioprotetora e a prevenção de injúrias causadas pelo estresse osmótico e toxicidade dos componentes químicos das soluções crioprotetoras durante a desidratação (VENDRAME, et al., 2014).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a influência de diferentes crioprotetores na criopreservação em nitrogênio líquido de sementes da orquídea brasileira *Catasetum atratum*.

3.1.3. Material e métodos

As sementes de *Catasetum atratum* Lindl. utilizadas foram obtidas por polinização artificial de plantas cultivadas em estufa do departamento de Agronomia da

Universidade Estadual de Londrina. As flores (Figura 12) foram polinizadas uma semana após antese e as cápsulas formadas foram colhidas maduras sete meses após a polinização.

Figura 12: Detalhe da flor masculina de *Catasetum atratum*.



Fonte: Faria et al. (2016)

As cápsulas fechadas foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio a 3% durante 20 minutos. As cápsulas foram abertas e as sementes retiradas em câmara de fluxo laminar. O teor de umidade foi obtido pelo método de estufa a $105\pm 3^{\circ}\text{C}$ conforme especificações das Regras para Análise de Sementes, assim como a viabilidade inicial das sementes, através do teste de tetrazólio (BRASIL, 2009). O teste de tetrazólio foi realizado colocando-se as sementes em água destilada por um período de 24 horas a 25°C para que ocorresse a hidratação. Em seguida, a água foi retirada e adicionada à solução de tetrazólio a 1%. As sementes permaneceram por mais 24 horas sob temperatura de 30°C e, com auxílio de uma lupa estereoscópica e o software Motic Images Plus 2.0ML, foi possível avaliar a viabilidade.

Os tratamentos consistiram na imersão de sementes em diferentes soluções crioprotetoras conforme Tabela 1.

Tabela 1: Composição dos tratamentos com soluções crioprotetoras utilizados para criopreservação de sementes de *Catsetum atratum*.

Tratamentos	Composição das soluções	Tempo e Temperatura de Exposição*
C1	Sem crioprotetor; sem imersão em NL	-
C2	Sem crioprotetor;	-
T1	G 2M	25°C - 20 min
T2	S 0,4M	25°C - 20 min
T3	G 2M + S 0,4M	25°C - 20 min
T4	PVS2	0°C - 10 min
T5	PVS2 + 1% FL	0°C - 10 min
T6	G 2M + PVS2	25°C - 20 min + 0°C - 10 min
T7	G 2M + PVS2 + 1% FL	25°C - 20 min + 0°C - 10 min
T8	S 0,4M + PVS2	25°C - 20 min + 0°C - 10 min
T9	S 0,4M + PVS2 + FL	25°C - 20 min + 0°C - 10 min
T10	G 2M + S 0,4M + PVS2	25°C - 20 min + 0°C - 10 min
T11	G 2M + S 0,4M + PVS2 + 1% FL	25°C - 20 min + 0°C - 10 min

C = controle; T = tratamento; G = glicerol; S = sacarose; PVS2 = Solução de vitrificação de Plantas 2; FL = floroglucinol; NL = Nitrogênio Líquido; TP = temperatura; TE = tempo de exposição. *Tratamentos constituídos por duas temperaturas e dois tempos de exposição foram primeiro submetidos a glicerol e/ou sacarose, 20 min a 25°C e posteriormente retirada a solução e adicionada solução de PVS2 com ou sem 1% de floroglucinol por 10 min a 0°C. **Fonte:** o próprio autor.

Para cada tratamento foram colocadas 5mg de sementes em criotubos com capacidade para 2,0 mL. No tratamento controle 1 (C1) as sementes foram retiradas das cápsulas e imediatamente germinadas, sem tratamento com crioprotetores e sem imersão em NL. No controle 2 (C2) as sementes foram imersas em nitrogênio e sem adição de nenhuma substancia crioprotetora.

Os demais tratamentos constituíram-se de 2 mL de uma das diferentes soluções crioprotetoras. T1, T2 e T3 foram expostas às soluções por 20 minutos a temperatura de 25°C. Nos tratamentos T4 e T5, que continham a solução de PVS2, as sementes foram expostas por 10 minutos a 0°C. Os tratamentos T6, T7, T8, T9, T10 e T11 as sementes foram imersas por 20 minutos a 25±2°C nas soluções contendo glicerol, sacarose e glicerol + sacarose e em seguida retiradas e colocadas nas soluções que continham PVS2 e PVS2 + 1% FL por 10 minutos em banho de gelo (0°). Todos os tratamentos mantiveram-se em agitação durante a exposição aos crioprotetores.

A solução de PVS2 contém 30% de glicerol (v/v), 15% de etileno glicol (v/v) e 15 % de dimetilsulfóxido – DMSO (v/v) em meio nutritivo MS contendo metade da concentração de sais e sacarose 0,4M (pH 5,7) (SAKAI; KOBAYASHI; OIYAMA, 1990).

Os criotubos com os tratamentos foram armazenados em nitrogênio líquido sob temperatura de -196°C durante 30 dias. Após a retirada das sementes do nitrogênio

líquido, a recuperação ocorreu por descongelamento em aparelho banho-maria da marca Evlab, modelo EV: 015 com precisão de 0,1°C, sob temperatura de 40°C durante 1,5 min. As soluções de criopreservação foram removidas dos criotubos e as sementes lavadas com água autoclavada por três vezes em câmara de fluxo laminar.

Uma parte das sementes foi submetida ao teste de tetrazólio para avaliação da viabilidade do embrião após o congelamento e a outra parte disposta em 10 frascos cada tratamento para cultivo *in vitro* contendo meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) modificado com a metade da concentração de macronutrientes com pH ajustado para 5,8 e solidificado com ágar 0,6% e colocada em sala de crescimento com temperatura e iluminação controlada para germinação.

Após 180 dias, a germinação das sementes foi avaliada por meio da frequência da formação de protocormos. Aos 360 dias após a germinação (DAG), foram avaliadas a sobrevivência dos protocormos, a altura das plântulas, o comprimento da raiz e a massa seca. A germinação foi avaliada com base no intumescimento das sementes e formação de protocormos.

Com base nas Regras de Análise de Sementes (BRASIL, 2009) e estudo minucioso das literaturas disponíveis sobre análises fitométricas de Orchidaceas, foi possível avaliar o comportamento do desenvolvimento de parte aérea e raízes de orquídeas e com as informações obtidas foi determinado o que seriam plântulas dentro da normalidade, através do pressuposto foi criado para esse trabalho um índice para identificar se as plântulas de orquídeas estavam dentro da normalidade considerando o desenvolvimento da parte aérea e raiz. Para isso, foi considerado que uma plântula normal de Orchidaceas tem a proporção de 1:2 (um de parte aérea para duas partes de raiz).

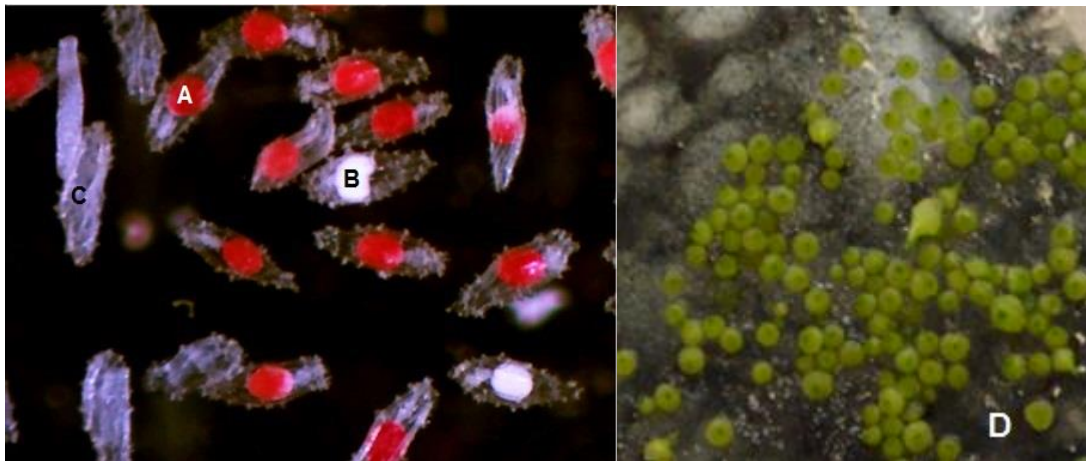
O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com dois controles, 11 tratamentos e 10 repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e com pos pressupostos atendidos as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5%. Para efeito estatístico os dados das variáveis fitométricas de massa seca de parte aérea e raiz foram submetidos a família BoxCox de transformação anteriormente a análise.

3.1.4. Resultados e discussão

As sementes de *Catasetum atratum* utilizadas no experimento apresentaram $69,7 \pm 3,30\%$ de sementes viáveis sem passar pelo processo de criopreservação. As sementes,

quando observadas em lupa estereoscópica, continham embriões bem formados e foi possível avaliar sua viabilidade pela coloração vermelha obtida através do teste de tetrazólio (Figura 13). O teor inicial de água foi de 7,02%.

Figura 13: Sementes de *Catasetum atratum* criopreservadas em solução PVS2 e posteriormente submetidas a teste de tetrazólio para verificar a sobrevivência do embrião, (A) – Embrião viável; (B) – Embrião não viável; (C) sementes sem embrião; (D) – Germinação das sementes criopreservadas em solução de PVS2 formando os protocormos após 180 dias da germinação.



Fonte: o próprio autor.

As sementes conservadas em PVS2 (T4), glicerol + PVS2 (T6) e sacarose + PVS2 + 1% de floroglucinol (T9) foram as que apresentaram maior viabilidade após a criopreservação: 67,7%, 66,1% e 69,8%, respectivamente. Não houve diferença estatística do controle 1, que apresentou 69,7% de sobrevivência. A sobrevivência foi determinada com o teste de viabilidade com sal de tetrazólio a 1%.

Carneiro (2014), utilizando soluções crioprotetoras de glicerol, sacarose e PVS2 sozinhas ou combinadas, testou a sobrevivência de sementes de sete espécies diferentes de orquídeas nativas do cerrado. Obteve as seguintes sobrevivências nos tratamentos que não utilizaram soluções crioprotetoras: *Cyrtopodium sainttlegerianum* (70,15%), *Cyrtopodium eugenii* (59,55%), *Epidendrum secundum* (69,15%), *Epidendrum nocturnum* (31,86%), *Epidendrum desciflorum* (42,85%), *Cohniella cepula* (63,62%), *Lockhartia goyazensis* (51,99%). Para essas espécies, os crioprotetores não foram eficientes. O experimento demonstrou que essas plantas não precisam de crioprotetor antes da imersão em nitrogênio líquido. Por outro lado, Souza (2015) concluiu em seu trabalho que o uso de crioprotetores foi

importante para a preservação das sementes de *Ionopsis utricularioides*. O tratamento mais indicado foi o realizado com glicerol 2 M com sacarose 0,4 M (20 min) e PVS2 (10 min).

O armazenamento de sementes a longo prazo em nitrogênio líquido é o método mais simples e eficiente para a conservação *ex situ* de recursos genéticos vegetais (GONZÁLEZ-BENITO; PÉREZ-GARCÍA, 2001). Este método surge como alternativa ao banco de sementes tradicional, onde frequentemente se verifica a deterioração das sementes (PÉREZ-GARCÍA; GONZÁLEZ-BENITO, 2008).

A formação de protocormos aos 180 DAG apresentou resultados estatisticamente semelhantes aos resultados do teste de tetrazólio. A sobrevivência foi maior nos protocormos de tratamentos T4 com 62,0% e T9, com e 65,4% de sobrevivência que também não diferiram do tratamento C1 que obteve 65,5%. O tratamento 6 apesar de ter alcançado alta viabilidade das sementes quando expostas ao tetrazólio não obteve bons resultados na sobrevivência dos procormos (37,2%), conseqüentemente não ocorrerá a formação de plântulas e desta forma não recomenda-se tal tratamento para essa espécie. As sementes submetidas aos crioprotetores dos tratamentos C2, T1, T2 e T3 não apresentaram sobrevivência dos protocormos.

Com base na Tabela 2, nota-se que, para esse tipo de orquídea, o PVS2 se mostrou mais eficiente que as outras soluções crioprotetoras. Os tratamentos que obtiveram o maior percentual de sobrevivência foram aqueles que apresentavam o PVS2 em sua fórmula, porém quando combinado com outros crioprotetores (glicerol e/ou sacarose) houve um efeito negativo. A alta concentração desses crioprotetores provocou toxicidade da solução às células criopreservadas, o que acarretou baixa sobrevivência dos embriões após o descongelamento. Os tratamentos C2, T1, T2, e T3 não apresentaram formação de protocormos.

Vendrame e Faria (2011) trabalhando com protocormos de *Dendrobium nobile* obtiveram resultados diferentes para esse tipo de tecidos. Os maiores índices de sobrevivência foram obtidos com protocormos tratados com glicerol 2M + PVS2 com 1% de floroglucinol. Os mesmos autores também verificaram que as plantas que se desenvolveram a partir desses protocormos não apresentavam anomalias no seu desenvolvimento. O tratamento T7 composto pela mesma combinação de soluções não apresentou resultados satisfatórios para sementes tanto na sobrevivência ($48,2 \pm 3,77$) quanto para as análises fitométricas e de massa seca. É provável que isso tenha ocorrido pelo fato da semente possuir menos água do que o protocormo. Desse modo, os crioprotetores foram aplicados com intuito de retirar água da célula para que não ocorresse a formação dos cristais de gelo. No caso da semente a

desidratação foi demasiada interferindo na atividade vital da célula. Ao contrário do protocolo que possui mais água, e para o sucesso na recuperação faz-se necessário uma maior desidratação.

Tabela 2: Sobrevivências das sementes de *Catsetum atratum* submetidas às diferentes soluções crioprotetoras logo após o descongelamento e aos 180 DAG através da formação de protocormos.

Tratamentos	Sobrevivência das sementes (%)	
	TTZ após descongelamento	Formação de protocormos (180DAG)
C1-Sem crioprotetor e sem imersão em NL	69,7±3,30 a	65,5±2,51 a
C2-Sem solução crioprotetora	7,6±1,77 f	-
T1- G 2M	9,6±1,90 f	-
T2- S 0,4M	10,6±1,78 f	-
T3- G 2M + S 0,4M	10,5±1,35 f	-
T4- PVS2	67,7±2,91 ab	62±1,63 ab
T5- PVS2 + 1%FL	41,9±2,33 e	36,8±2,20 d
T6- G 2M +PVS2	66,1±3,31 ab	37,2±2,78 d
T7- G 2M + PVS2 + 1% FL	48,2±3,77 d	39,0±2,05 d
T8- S 0,4M + PVS2	64,4±3,03 bc	61,6±3,06 b
T9- S 0,4M + PVS2 + 1% FL	69,8±2,66 a	65,4±3,13 a
T10- G 2M + S 0,4M +PVS2	43,4±3,27 e	39,1±2,33 d
T11- G 2M + S 0,4M + PVS2 + 1%FL	61,4±3,41 c	55,6±2,50 c
CV (%)	6,32	4,88

*TTZ= Teste de sal de tetrazólio realizado logo após a retirada das sementes do nitrogênio líquido para verificar a viabilidade das sementes; DAG = dias após a germinação. Médias na coluna seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p = 0,05$). **Fonte:** o próprio autor.

A altura da parte aérea no tratamento T4 apresentou resultado estatisticamente semelhante ao tratamento C1, $3,16 \pm 0,31$ cm e $3,65 \pm 0,51$ cm, respectivamente, diferindo dos demais tratamentos. A massa seca da parte aérea apresentou o mesmo padrão de resultados, com média de $16,80 \pm 2,33$ mg para o tratamento controle 1 e $14,57 \pm 1,42$ mg para o tratamento 4 (PVS2), não diferindo entre si.

As raízes apresentaram maior crescimento nos tratamentos T8 e T9, $8,41 \pm 0,54$ cm e $9,85 \pm 0,50$ cm, respectivamente, com semelhança na variável massa seca da raiz (MSR) como pode ser verificado na Tabela 3. Porém, comparando o desenvolvimento da

parte aérea com a raiz, é possível notar uma elevada quantidade anormal durante o processo de desenvolvimento de raízes nesses tratamentos (T8 e T9).

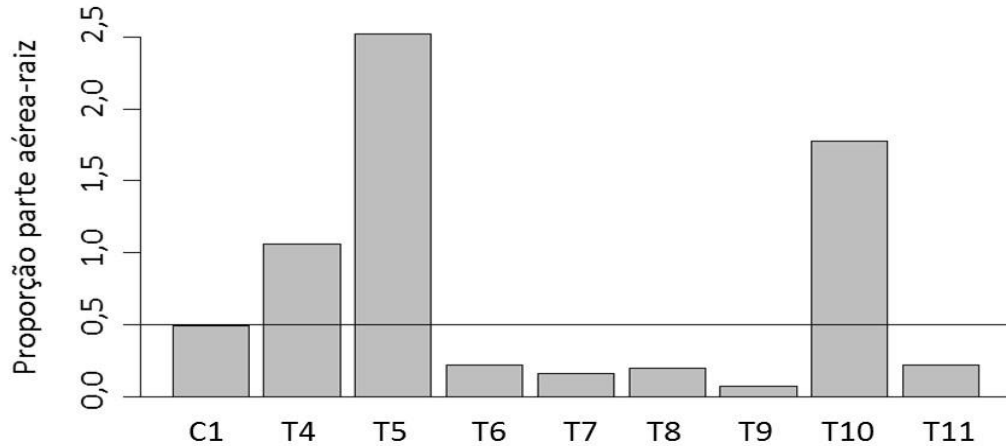
Tabela 3: Altura da parte aérea (APA), massa seca da parte aérea (MSPA), comprimento da raiz (CR) e massa seca da raiz (MSR) de *Catassatum atratum*, 360 dias após a germinação (DAG), referente aos tratamentos com e sem diferentes soluções crioprotetoras.

Tratamentos	APA (cm)	MSPA (mg)	CR (cm)	MSR (mg)
	360 DAG			
C1- Sem crioprotetor e sem imersão em NL	3,65±0,51a	16,80±2,33 a	7,40±0,73 b	35,72±3,55 c
T4- PVS2	3,16±0,31 a	14,57±1,42 a	3,00±0,12 c	14,48±0,58 d
T5- PVS2 + 1%FL	0,52±0,03 de	2,41±0,15 de	0,21±0,17 f	1,00±0,83 g
T6- G 2M +PVS2	0,32±0,07 e	1,47±0,32 e	1,49±0,13 d	7,19±0,63 e
T7- G 2M + PVS2 + 1% FL	0,53±0,15 de	2,45±0,69 de	3,45±0,34 c	16,65±1,63 d
T8- S 0,4M + PVS2	1,62±0,15 b	7,47±0,68 b	8,41±0,54 ab	69,78±5,96 a
T9- S 0,4M + PVS2 + 1% FL	0,66±0,20 d	3,05±0,93 d	9,85±0,50 a	47,58±2,43 b
T10- G 2M + S 0,4M +PVS2	0,87±0,29 cd	4,02±1,33 cd	0,52±0,12 e	2,52±0,58 f
T11- G 2M + S 0,4M + PVS2 + 1%FL	1,75±0,86 bc	8,04±3,99 bc	8,35±0,66 b	49,33±1,85 b
CV (%)	25,85	25,85	9,11	9,60

*Os tratamentos C2, T1, T2 e T3 não foram incluídos na Tabela, pois, não sobreviveram. Médias na coluna seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (p = 0,05). **Fonte:** o próprio autor.

As regras de análises de sementes (BRASIL, 2009) descrevem que são consideradas plântulas com pequenos defeitos aquelas que apresentam pequenas anomalias em suas estruturas iniciais, desde que mostrem um desenvolvimento satisfatório e equilibrado quando comparadas com outra plântula intacta do mesmo teste. Através do índice de raízes da Figura 14, pode-se notar os tratamentos que ficaram dispostos mais próximos ao considerado desenvolvimento normal (1:2; parte aérea:raiz).

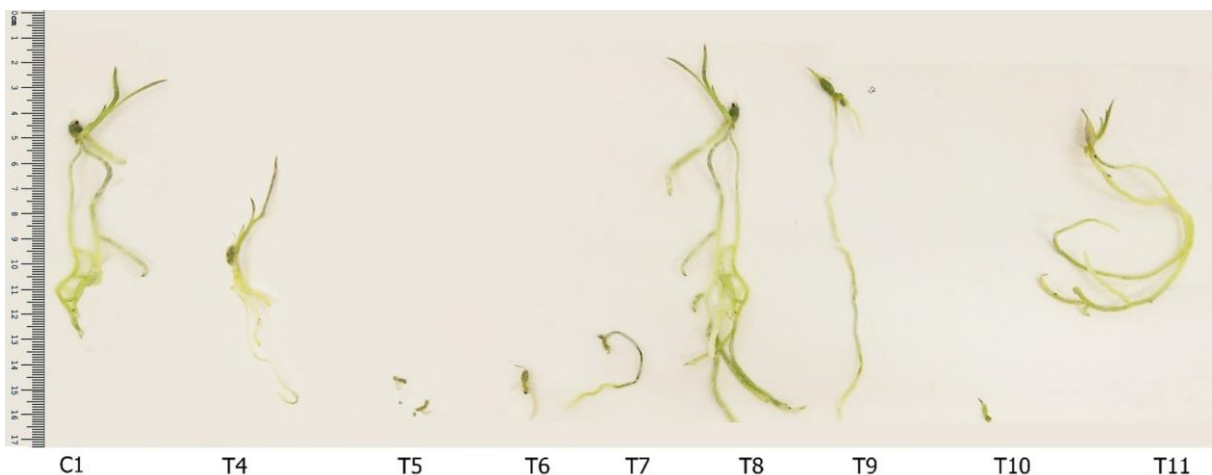
Figura 14: Índice de proporção parte aérea-raiz de plântulas de *Catasetum atratum* 360 dias após descongelamento, em que plantas com proporcionalidade mais próximas de 1:2 (0,5) possuem maior probabilidade de desenvolvimento.



*C1 - controle sem imersão em solução crioprotetora e sem imersão em nitrogênio líquido; C2 - sem solução crioprotetora; T1 - glicerol (G) 2M; T2 - sacarose (S) 0,4 M; T3 - G 2M + S 0,4M; T4 - Solução de vitrificação de plantas 2 (PVS2); T5 - PVS2 + 1% de floroglucinol (FL); T6 - G 2M+ PVS2; T7 - G 2M + PVS2 + 1%FL; T8 - S 0,4M + PVS2; T9 - S 0,4M+ 1% FL; T10 - G 2M + S 0,4M + PVS2; T11 - G 2M + S 0,4M + PVS2 + 1%FL. **Fonte:** o próprio autor

Em alguns dos tratamentos com crioprotetores de *C. atratum* as plântulas não obtiveram desenvolvimento pleno, o que é evidenciado na Figura 15. Se comparadas ao controle 1 (C1), nota-se o não desenvolvimento das plântulas dos tratamentos T5, T6, T7 e T10; e o desenvolvimento demasiado das raízes e reduzida parte aérea nos tratamentos T8, T9 e T11.

Figura 15: Plântulas de *Catasetum atratum* obtidas de sementes criopreservadas submetidas a diferentes tratamentos com soluções crioprotetoras 360 dias após a germinação.



*Plântulas 360 DAG. Os tratamentos C2, T1, T2 e T3 não sobreviveram. C1 - controle sem imersão em solução crioprotetora e sem imersão em nitrogênio líquido; C2 - sem solução crioprotetora; T1 - glicerol (G) 2M; T2 - sacarose (S) 0,4 M; T3 - G 2M + S 0,4M; T4 - Solução de Vitrificação de Plantas 2 (PVS2); T5 - PVS2 + 1% de floroglucinol (FL); T6 - G 2M+ PVS2; T7 - G 2M + PVS2 + 1%FL; T8 - S 0,4M + PVS2; T9 - S 0,4M+ 1% FL; T10 - G 2M + S 0,4M + PVS2; T11 - G 2M + S 0,4M + PVS2 + 1%FL. **Fonte:** o próprio autor.

Taiz e Zeiger (2004) descrevem que plantas crescidas na presença de etileno possuem um maior alongamento da raiz. Esse fato também pode estar relacionado à biossíntese de ácido indolacético (AIA), pois a biossíntese de AIA está relacionada a tecidos que crescem e se desenvolvem rapidamente. Kerbauy (2008) salienta que, em plantas cultivadas *in vitro*, foi observado que certos conjugados facilitam o crescimento da parte aérea, mas não das raízes, enquanto outros têm efeito oposto como ocorreu com as raízes de *C. atratum*.

A conjugação covalente de aminoácidos ao AIA pode resultar em inativação permanente. Entretanto, a maioria das conjugações de aminoácido serve como forma de reserva, da qual o AIA pode ser rapidamente liberado por processos enzimáticos. O ácido indol-3-butírico (AIB), tanto livre como conjugado, é um composto que ocorre naturalmente em plantas e serve como fonte de auxina para processos específicos do desenvolvimento. Esse ácido é facilmente convertido em AIA por β -oxidação e rotineiramente utilizado como enraizador (TAIZ; ZEIGER, 2004).

No cultivo *in vitro* convencional, as plântulas são cultivadas em frascos fechados impossibilitando as trocas gasosas. Esse método possui alta umidade relativa do ar ($\pm 98\%$), alta concentração de etileno, baixa concentração de CO_2 (menos de $100 \mu\text{mol mol}^{-1}$ no período luminoso), baixa densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos ($40 - 50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), e com sacarose como principal fonte de energia metabólica (ARIGITA; GONZALES; TAMÉS, 2002).

As altas concentrações de açúcares nos crioprotetores, combinados com a sacarose presente no meio de cultivo, agiram de forma tóxica as sementes o que acarretou em um desenvolvimento anormal das plantas. A despeito disso, é possível afirmar que essas soluções causaram a produção desses hormônios de crescimento através de alterações fisiológicas causadas nas sementes. Em algumas espécies, as auxinas se conjugam a glicanos complexos (unidades múltiplas de açúcares) ou glicoproteínas, mas ainda não se conhece o papel fisiológico exato desses conjugados como descreve Taiz e Zeiger (2004).

Outro fator que pode estar relacionado ao desenvolvimento excessivo de raízes são as condições de crescimento (temperatura, umidade relativa e luminosidade). Ferreira (2014) trabalhou com cultivo *in vitro* de três diferentes orquídeas: *Cattleya warneri*, *Epidendrum secundum* e um cruzamento de *Encyclia pauciflora* X *Encyclia osmantha*. Seu experimento foi baseado em como as alterações do ambiente afetavam o cultivo delas. Para isso, ela cultivou as plantas em casa de vegetação e em sala de crescimento com ambiente

controlado, ambos utilizando frascos de vidros com tampa. Um dos resultados obtidos pela autora foi que, para matéria seca da raiz, a espécie *C. warneri* não apresentou diferença entre os tratamentos. Já para o cruzamento *E. pauciflora* X *E. osmantha*, a sala de crescimento apresentou um maior incremento de raiz do que as plântulas desenvolvidas em casa de vegetação. O *E. secundum* também obteve um maior desenvolvimento de raiz na sala de crescimento. Portanto, técnicas de cultura de tecidos e micropropagação in vitro são ferramentas úteis para muitas finalidades e podem ser utilizadas de acordo com as necessidades de cada espécie (CARNEIRO, 2014).

Deve ser considerado ainda que os crioprotetores são substâncias químicas que reduzem a injúria sofrida pela célula durante os processos de congelamento e descongelamento. Os mais comumente utilizados e capazes de passar pelas membranas celulares são o propilenoglicol, etilenoglicol, metanol, glicerol e dimetilsulfóxido (DMSO). Entretanto, esses crioprotetores podem ser tóxicos ou podem causar estresse osmótico, levando as células à morte ou a modificar sua resposta morfo genética em cultura (DAY; MCLELLAN, 1995). Isso seria outro fator que explicaria o crescimento excessivo de raízes nos tratamentos com PVS2, que é uma solução composta por etilenoglicol, glicerol e DMSO.

Métodos de criopreservação permitem a conservação de recursos genéticos vegetais por longos períodos. Porém, é um processo bastante detalhado e oferece alguns riscos com relação ao acesso ao material vegetal e a retomada do desenvolvimento quando não realizado de forma adequada (PILATTI et al., 2010).

3.1.5. Conclusão

A utilização de soluções crioprotetoras é indicada na criopreservação de sementes de *Catsetum atratum*; O tratamento 4 (PVS2 isoladamente) com 67,7% e o tratamento 9 (Sacarose + PVS2 + 1% FL) com 69,8% foram os que proporcionaram maior sobrevivência de sementes e formação de protocormos com 62,0% e 65,4% respectivamente. Entretanto, apenas T4 é indicado para a criopreservação desta espécie, pois foi o único que apresentou germinação de plântulas sem anomalia com proporções adequadas de parte aérea e raiz.

3.2. FLOROGLUCINOL NA CRIOPRESERVAÇÃO DE SEMENTES DA ORQUÍDEA EM RISCO EXTINÇÃO *Cattleya walkeriana* Gardner

3.2.1. Resumo

A *Cattleya walkeriana* é uma orquídea nativa do Brasil que ocorre em diferentes tipos de ambientes. Esta espécie é classificada como “vulnerável” à extinção. Embora a vitrificação tenha sido relatada como um método bem-sucedido para a criopreservação de sementes, os crioprotetores utilizados na solução são tóxicos para muitas espécies. A utilização de Solução de Vitrificação de Plantas 2 (PVS2) no tratamento das sementes vem obtendo sucesso para conservação de sementes. Diversas substâncias têm sido testadas para minimizar os danos causados às células, dentre elas o floroglucinol. O objetivo do presente trabalho foi avaliar diferentes concentrações de floroglucinol na criopreservação em nitrogênio líquido de sementes da orquídea brasileira *Cattleya walkeriana*. Os tratamentos foram compostos pela solução de vitrificação de plantas – PVS2 e diferentes concentrações de floroglucinol (FL), sendo: T0 – sem adição de PVS2 e sem floroglucinol; T1 – PVS2; T2 – PVS2 + 0,10% de FL; T3 – PVS2 + 0,25% de FL; T4 – PVS2 + 0,50% de FL; T5 – PVS2 + 1% de FL; T6 – PVS2 + 2% de FL; T7 – PVS2 + 3% de FL; T8 – PVS2 + 4% de FL; T9 – PVS2 + 5% de FL. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com dez tratamentos e dez repetições. As sementes apresentaram viabilidade inicial de 85,58%. Para T1, T2, T3 e T4 as porcentagens de sobrevivências foram de 74,31%; 74,00%; 75,22% e 77,93%, respectivamente, não houve diferença estatística entre os tratamentos. Entretanto, T5 e T6 diferiram estatisticamente dos demais com viabilidade de 84,98% e 84,21%, nessa ordem. O PVS2 + 1% e 2% de floroglucinol foram os que obtiveram melhor sucesso na germinação após congelamento.

Palavras-chave: Crioconservação, Nitrogênio líquido, PVS2, vitrificação.

FLOROGLUCINOL IN CRYOPRESERVATION OF ORCHID SEEDS AT RISK OF EXTINCTION *Cattleya walkeriana* Gardner

Abstract

Cattleya walkeriana is an orchid native to Brazil that occurs in different types of environments. This species is classified as "vulnerable" to extinction. Although vitrification has been reported as a successful method for cryopreservation of seeds, the cryoprotectants used in the solution are toxic to many species. The use of Plant Vitrification Solution 2 (PVS2) in seed treatment has been successful for seed conservation. Several substances have been tested to minimize damage to cells, including phloroglucinol. The aim of the present work was to evaluate different concentrations of phloroglucinol in the liquid nitrogen cryopreservation of seeds of the Brazilian orchid *Cattleya walkeriana*. The treatments were composed by the solution of vitrification of plants - PVS2 and different concentrations of phloroglucinol (PL), being: T0 - without addition of PVS2 and without floroglucinol; T1-

PVS2; T2-PVS2 + 0.10% PL; T3-PVS2 + 0.25% PL; T4-PVS2 + 0.50% PL; T5-PVS2 + 1% PL; T6-PVS2 + 2% PL; T7-PVS2 + 3% PL; T8-PVS2 + 4% PL; T9-PVS2 + 5% PL. The experimental design was a completely randomized design with ten treatments and ten replications. The seeds presented initial viability of 85.58%. For T1, T2, T3 and T4 survival percentages were 74.31%; 74.00%; 75.22% and 77.93%, respectively, there was no statistical difference between treatments. However, T5 and T6 differed statistically from the others with viability of 84.98% and 84.21%, in that order. The PVS2 + 1% and 2% phloroglucinol were the ones that obtained the best success in the germination after freezing.

Keywords: Cryoconservation, liquid nitrogen, PVS2, vitrification.

3.2.2. Introdução

As *Cattleya*, em razão da estrutura de suas flores, podem ser ligadas a muitos outros gêneros e híbridos de flores exuberantes e, por isso, são as orquídeas mais comercializadas na atualidade, o que lhes confere considerável importância econômica (ZANENGA-GODOY; COSTA, 2003). Apesar do cultivo de orquídeas ter colaborado para tornar o Brasil conhecido por suas plantas exóticas, elas são na maior parte obtidas através do extrativismo (KÄMPF, 1997).

O gênero “*Cattleya*” possui mais de 70 espécies descritas, inúmeros híbridos, e grande parte das espécies são típicas da flora brasileira. O gênero foi descrito por John Lindley em 1824 e seu centro de origem são as Américas Tropical e Subtropical, entre o México e o Brasil. As plantas desse gênero são epífitas e com crescimento simpodial, suas flores vistosas e quase sempre muito perfumadas (TAKANE; YANAGISAWA; PIVETTA, 2010). A *Cattleya walkeriana* é uma orquídea nativa do Brasil que ocorre em diferentes tipos de ambientes e possui alto valor econômico. Esta espécie é classificada como “vulnerável” à extinção (MARTINELLI; MORAES, 2013).

A maneira natural das plantas se propagarem em seu ambiente de origem é através de sementes e com elas é possível a manutenção da espécie por longos períodos de tempo. Programas de melhoramento genético visam aperfeiçoar técnicas que aumentem e mantenham a qualidade do material biológico aumentando a longevidade da semente de forma previsível (SANTOS, 2000). Estabelecer bancos de sementes para a preservação de espécies ameaçadas de extinção é de extrema importância.

Pesquisas na área de criobiologia são conduzidas há pouco mais de dez anos na tentativa de esclarecer os mecanismos biológicos que controlam a tolerância ao estresse

sofrido pelo germoplasma quando congelado e descongelado para, assim, refinar e simplificar cada vez mais essa técnica. A utilização de soluções crioprotetoras é fundamental para que as sementes tolerem temperaturas ultrabaixas ao serem armazenadas em nitrogênio líquido. As técnicas de criopreservação desenvolvidas mais recentemente são mais simples e estão baseadas na vitrificação (VENDRAME et al., 2014).

Embora a vitrificação tenha sido relatada como um método bem-sucedido para a criopreservação de células de orquídeas, órgãos e tecidos, as soluções incluem crioprotetores que são tóxicos para muitas plantas (SARKAR; NAIK, 2000). Vários autores têm relatado sucesso na criopreservação quando utilizada a Solução de Vitrificação de Plantas 2 (PVS2) no tratamento das sementes (CARVALHO, 2006; CARNEIRO, 2014; SOUZA, 2015). Diversas substâncias são combinadas e testadas para minimizar os danos causados as células, dentre elas o floroglucinol.

O floroglucinol é um benzenotriol conhecido pela sua propriedade reguladora. Foi relatado que o floroglucinol estimula o crescimento e a produção de brotos axilares em várias plantas lenhosas. Também é utilizado como estimulante na formação de raízes adventícias em plântulas cultivadas in vitro de diferentes espécies arbóreas e para aumentar a sobrevivência de meristemas (DEMIRALAY et al., 1998). Possuem um efeito sinérgico com a auxina durante o crescimento inicial da raiz. (SHARIFIAN et al., 2009). O floroglucinol é também conhecido por proteger as células contra os danos oxidativos causados pelos radicais livres e possuir um efeito crioprotetor contra o metabolismo relacionado ao estresse oxidativo (KANG et al., 2006).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar diferentes concentrações de floroglucinol na criopreservação em nitrogênio líquido de sementes da orquídea brasileira em risco de extinção *Cattleya walkeriana* Lindl..

3.2.3. Material e métodos

O experimento foi realizado no departamento de Agronomia da Universidade Estadual de Londrina. As sementes de *Cattleya walkeriana* Lindl. utilizadas foram obtidas por polinização artificial de plantas cultivadas em estufa. As flores foram polinizadas uma semana após antese e as cápsulas formadas colhidas maduras nove meses após a polinização.

As cápsulas fechadas foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio a 3% durante 20 minutos. As cápsulas foram abertas e as sementes retiradas em câmara

de fluxo laminar. O teor de umidade foi obtido pelo método de estufa a 105°C, conforme especificações das Regras para Análise de Sementes, assim como a viabilidade inicial das sementes por meio do teste de tetrazólio (BRASIL, 2009).

O teste de tetrazólio foi realizado colocando as sementes em água destilada por um período de 24 horas a 25°C para que ocorresse a hidratação das sementes. Em seguida, a água retirada e adicionada a solução de tetrazólio a 1%. As sementes permaneceram por 24 horas sob temperatura de 30°C e, com auxílio de uma lupa estereoscópica e o software Motic Images Plus 2.0ML, avaliada a viabilidade das sementes (SUZUKI et al., 2015).

Os tratamentos foram compostos pela solução de vitrificação de plantas – PVS2 (Solução de Vitrificação de Plantas 2) e diferentes concentrações de floroglucinol, sendo: T0 – sem adição de PVS2 e sem floroglucinol; T1 – PVS2; T2 – PVS2 + 0,10% de floroglucinol; T3 – PVS2 + 0,25% de floroglucinol; T4 – PVS2 + 0,50% de floroglucinol; T5 – PVS2 + 1% de floroglucinol; T6 – PVS2 + 2% de floroglucinol; T7 – PVS2 + 3% de floroglucinol; T8 – PVS2 + 4% de floroglucinol; T9 – PVS2 + 5% de floroglucinol. A solução PVS2 é composta de 30% de glicerol (v/v), 15% de etileno glicol (v/v) e 15 % de dimetilsulfóxido – DMSO (v/v) em meio nutritivo MS contendo metade da concentração de sais e sacarose 0,4M (pH 5,7) (SAKAI; KOBAYASHI; OIYAMA, 1990). Foram utilizados criotubos com capacidade para 2,5 mL. Para cada tratamento foram utilizados 3 mg de sementes e 2 mL de uma das diferentes soluções crioprotetoras.

Os criotubos com os tratamentos foram armazenados em nitrogênio líquido sob temperatura de -196°C durante 15 dias. Após a retirada das sementes do nitrogênio líquido, a recuperação ocorreu por descongelamento em aparelho banho-maria sob temperatura de 40°C durante 1,5 min. As soluções de criopreservação foram removidas dos criotubos e as sementes lavadas com água autoclavada por três vezes em câmara de fluxo laminar.

Uma parte das sementes foi submetida ao teste de tetrazólio para avaliação da viabilidade do embrião após o congelamento e a outra parte disposta em dez frascos para cultivo *in vitro* contendo meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) modificado com a metade da concentração de macronutrientes com pH ajustado para 5,8 e solidificado com ágar 0,6% e colocada em sala de crescimento com temperatura e iluminação controlada para germinação. Aos 90 dias foi realizada a repicagem e disposto dez protocormos por frasco. Aos 300 dias após a germinação (DAG) a altura da parte aérea, o comprimento da raiz, a massa seca da parte aérea e raiz foram mensuradas.

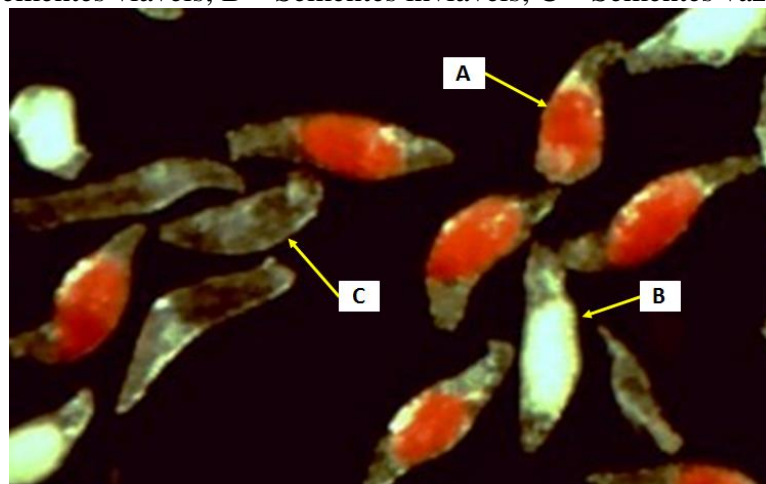
Com base nas Regras de Análises de Sementes (BRASIL, 2009) e literatura disponíveis sobre análises fitométricas de orquídeas foi estabelecido um padrão e definido uma proporcionalidade de um de parte aérea para duas partes de raiz (1:2), considerando plantas mais próximas dessa proporção dentro da normalidade e com maior sucesso de desenvolvimento.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com dez tratamentos e dez repetições. Os dados foram submetidos primeiro a análise de variância (ANOVA) e com os pressupostos atendidos aplicado o teste Tukey 5% de comparação de médias para verificar a diferença entre os tratamentos e posteriormente a regressão cubica avaliando a melhor concentração do floroglucinol.

3.2.4. Resultados e discussão

O teor inicial de água nas sementes de *Cattleya walkeriana* foi de 6,91% e apresentavam porcentagem inicial de embriões viáveis de $85,58 \pm 2,67\%$ verificados através do teste de tetrazólio. Sementes que apresentam embrião com coloração vermelho intenso são consideradas viáveis, com coloração inviáveis e sem o embrião são as vazias conforme observadas na Figura 16.

Figura 16: Sementes criopreservadas e tratadas com PVS2 + 1% de floroglucinol de *Cattleya walkeriana* submetidas a teste tetrazólio para verificar a viabilidade do embrião através da coloração: A – Sementes viáveis; B – Sementes inviáveis; C – Sementes vazias.



Fonte: o próprio autor

Através do teste de tetrazólio foi possível verificar a porcentagem de sobrevivência das sementes após o descongelamento. Verificaram-se que as sementes imersas

em nitrogênio líquido sem tratamento com o PVS2 diferiam estatisticamente entre si. O tratamento T0 apresentou porcentagem de sobrevivência de 5,08% menor que T1, sendo as sobrevivências de 69,23% e 74,31%, respectivamente (Tabela 4.). Com isso, é possível verificar que há necessidade das sementes serem tratadas com soluções crioprotetoras antes de serem mantidas sob temperatura de -196°C.

Tabela 4: Sobrevivência das sementes de *Cattleya walkeriana* submetidas à solução de criopreservação Solução de Vitrificação de Plantas 2 (PVS2) com diferentes concentrações de floroglucinol (FL).

Tratamentos	Sobrevivência (%)
T0 – sem adição de solução	69,23±4,26 d
T1 – PVS2	74,31±3,49 bc
T2 – PVS2 + 0,10% FL	74,00±2,32 bcd
T3 – PVS2 + 0,25% FL	75,22±2,38 b
T4 – PVS2 + 0,50% FL	77,93±2,26 b
T5 – PVS2 + 1,0% FL	84,98±3,11 a
T6 – PVS2 + 2,0% FL	84,21±2,45 a
T7 – PVS2 + 3,0% FL	69,86±1,34 cd
T8 – PVS2 + 4,0% FL	50,15±5,88 e
T9 – PVS2 + 5,0% FL	16,14±3,16 f
CV (%)	18,20

*Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey.

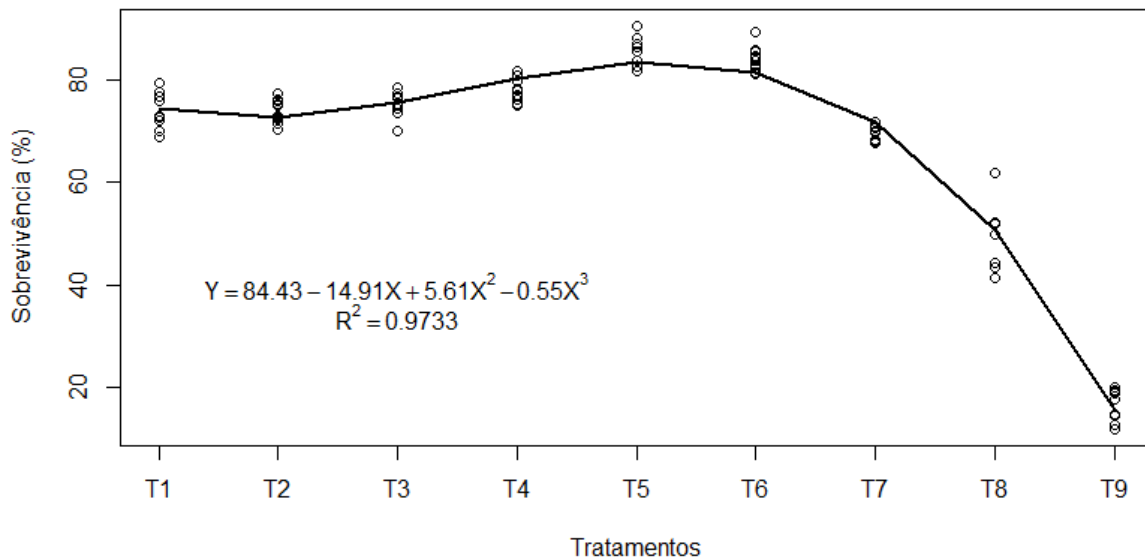
Os resultados obtidos com o aumento da concentração do floroglucinol apresentaram diferença significativa na viabilidade das sementes. Os tratamentos T5 e T6, que continham 1% e 2% de floroglucinol, obtiveram maior sucesso na recuperação após o descongelamento: sobrevivência de 84,98% e 84,21%, respectivamente, diferindo estatisticamente da concentração 0% (tratamento T1). As sementes tratadas apenas com solução PVS2 apresentaram sobrevivência de 74,31%.

Nas concentrações 0,00%; 0,10%; 0,25% e 0,50% de floroglucinol as sobrevivências se mantiveram não havendo diferença estatística entre as amostras. Nessas concentrações, não é necessária utilização de floroglucinol, pois essa não interfere no resultado final. Porém, se comparadas aos tratamentos T5 e T6 que continham 1% e 2% de floroglucinol, a sobrevivência desses tratamentos foi superior em até 10,98% com sobrevivência de 84,98% e 84,21%, entretanto esses tratamentos não diferiram entre si. Esses tratamentos apresentaram a mesma porcentagem de sobrevivência que a inicial antes de passar pelo processo de congelamento.

Em consequência do aumento das concentrações nos tratamentos foi observado que houve redução significativa na viabilidade dos embriões quando comparados ao inicial de 15,72% no tratamento 7, 35,43% no tratamento 8 e chegando até 69,44% no tratamento 9.

Através dos resultados obtidos, foi possível verificar que 97,33% da variável dependente consegue ser explicada pelos regressores presentes no modelo estatístico da Figura 17.

Figura 17: Regressão cúbica da porcentagem de sobrevivência das sementes de *Cattleya walkeriana* submetidas a tratamento com solução de Solução de Vitriificação de Plantas 2 (PVS2) com diferentes concentrações de floroglucinol.



*FL= Floroglucinol; PVS2= Solução de Vitriificação de Plantas 2, T0 – sem adição de PVS2 e sem FL; T1 – PVS2; T2 – PVS2 + 0,10% FL; T3 – PVS2 + 0,25% FL; T4 – PVS2 + 0,50% FL; T5 – PVS2 + 1% FL; T6 – PVS2 + 2% FL; T7 – PVS2 + 3% FL; T8 – PVS2 + 4% FL; T9 – PVS2 + 5FL. **Fonte:** o próprio autor

Para o comprimento de raízes, apenas T8 e T9 diferem de T0. A altura da parte aérea, massa seca de raízes e parte aérea apenas T9 diferiu dos demais tratamentos testados. Embora os tratamentos tenham interferido na sobrevivência das sementes isso não afetou o desenvolvimento da planta, pois a proporcionalidade avaliada entre a parte aérea e as raízes mostram que as plântulas tiveram um crescimento dentro da normalidade, próximo a 0,5, exceto o tratamento nove que obteve o dobro da proporção considerada adequada apresentado 0,96. Apenas a concentração de 5% de floroglucinol interferiu no desenvolvimento das plantas (Tabela 5).

Existem vários relatos de que compostos fenólicos, em particular o floroglucinol, estimula o enraizamento e o desenvolvimento de brotos em culturas como maçã, pêra, ameixa e cacau, embora alguns resultados com maçã tenham mostrado que esse composto pode ser ineficaz (HAMMATT, 1994).

O floroglucinol é um composto extraído de algas marrom e conhecido por proteger as células contra o estresse oxidativo, inflamação e danos por radicais livres (KANG et al., 2006, KIM; KIM, 2010). A fotossíntese é um processo de grande complexidade que envolve numerosas reações de conversão de energia e bioquímicas. Tanto a fotossíntese quanto a respiração celular são constituídas por um conjunto de reações de redução e oxidação sequenciais - reações redox (KERBAUY, 2008). Como o floroglucinol é um composto que age na diminuição da oxidação das células, a sua alta concentração pode ter interferido no processo de fotossíntese ocasionando a redução no tamanho da planta e consequentemente em sua massa seca no tratamento 9.

Tabela 5: Altura da parte aérea (APA), massa seca da parte aérea (MSPA), comprimento da raiz (CR) e massa seca da raiz (MSR) e índice de proporcionalidade parte aérea-raiz (IP) aos 300 dias após a germinação de referente aos tratamentos com e sem diferentes soluções crioprotetoras em sementes de *C. walkeriana*.

Tratamentos	APA (mm)	MSPA (mg)	CR (mm)	MSR (mg)	IP (1:2)
T0 – sem crioprotetor	38,27 a	17,63	71,02 a	39,96 a	0,54
T1 – PVS2	37,84 a	17,43	60,63 ab	31,38 a	0,62
T2 – PVS2 + 0,10% F	34,10 a	15,71	65,82 ab	33,96 a	0,52
T3 – PVS2 + 0,25% F	31,13 a	16,65	58,65 ab	31,48 a	0,53
T4 – PVS2 + 0,5% F	36,74 a	16,93	68,88 ab	31,06 a	0,53
T5 – PVS2 +1% F	34,66 a	15,97	71,54 a	32,99 a	0,48
T6 – PVS2 + 2% F	35,80 a	16,50	64,60 ab	36,34 a	0,55
T7 – PVS2 + 3% F	35,68 a	16,44	56,86 ab	31,98 a	0,63
T8 – PVS2 + 4% F	36,56 a	16,85	55,07 b	30,98 a	0,66
T9- PVS2 + 5% F	20,61 b	9,39	21,46 c	12,07 b	0,96
CV(%)	17,45	21,08	18,20	24,41	

*F = floroglucinol; IP= Índice de proporção parte aérea-raiz de plântulas aos 300 dias após descongelamento, em que plantas com proporcionalidade mais próximas de 1:2 (0,5) possuem maior probabilidade de desenvolvimento.

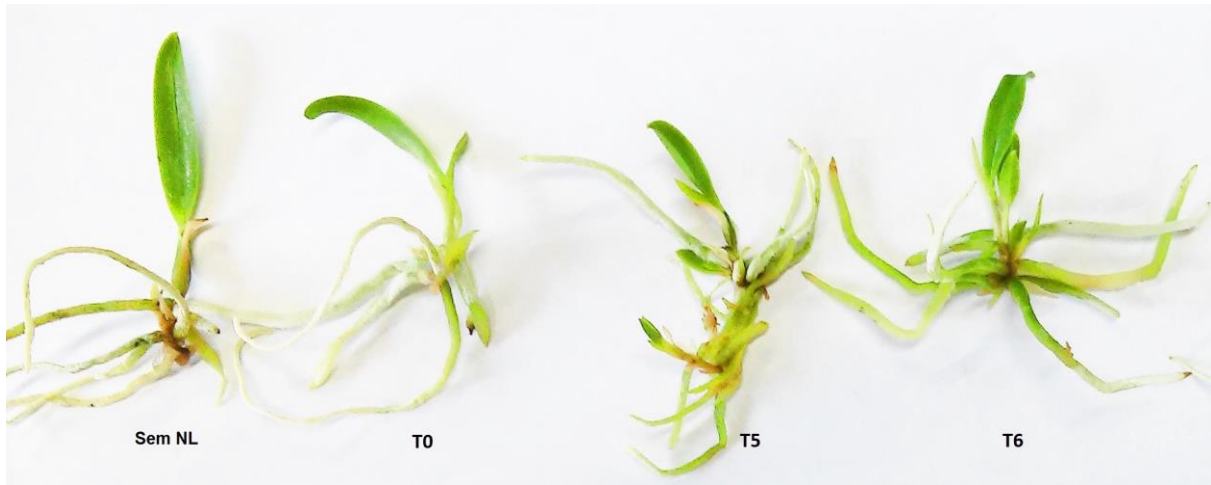
Galdiano Júnior et al. (2012) salientam que dois dos principais fatores para vitrificação bem-sucedida são a seleção adequada de crioprotetores e o tempo de exposição do tecido a soluções de vitrificação para reduzir a toxicidade potencial para as células vegetais e melhorar a recuperação da criopreservação. O floroglucinol mostrou-se eficaz na recuperação e sobrevivência de protocormos criopreservados de *Dendrobium nobile*. Os mesmos autores descrevem que a porcentagem de germinação foi de 49% quando as sementes da mesma espécie foram tratadas apenas com PVS2, mas obteve aumento na viabilidade em até 79% nos tratamentos que continham PVS2 + 1% de floroglucinol, enquanto que no tratamento controle a porcentagem foi de 3,1%, salientam ainda que, para todos os tratamentos, as plantas obtidas eram morfológicamente semelhantes ao controle.

Vendrame e Faria (2011) obtiveram melhores resultados quando os protocormos de *Dendrobium nobile* foram tratados com a combinação de glicerol 2M + PVS2+ 1% de floroglucinol, esse tratamento apresentou 68% de sobrevivência, 37% a mais de sobrevivência quando comparadas ao tratamento que utilizou apenas glicerol 2M + PVS2. Eles descrevem ainda em seu trabalho que a adição do floroglucinol não alterou a morfologia, plantas originárias dos protocormos desse tratamento não apresentavam anomalias.

As plântulas de *Cattleya walkeriana* cultivadas *in vitro* estavam dentro dos parâmetros considerados normais conforme observado na Figura 18. Nesse critério incluem-se plântulas com todas as suas estruturas essenciais bem desenvolvidas, completas, proporcionais e saudáveis. Primeiramente, houve desenvolvimento em protocormos de coloração verde-clara e, posteriormente, dessa estrutura obtém-se os primórdios foliares e rizoides, exceto o tratamento T9 que apresentou redução em seu crescimento.

Figura 18: Plântulas de *Cattleya walkeriana* cultivadas *in vitro*: plantas correspondentes aos melhores tratamentos com adição de solução crioprotetora com 1% e 2% de floroglucinol (T5

e T6) em comparação com a planta criopreservada sem adição de nenhuma solução (T0) e plantas cultivadas sem serem submetidas a criopreservação (Sem NL) não apresentando diferença na morfologia.



Fonte: o próprio autor

Souza (2015), trabalhando com sementes de *Ionopsis utricularioides* obteve maior porcentagem de germinação nos tratamentos que utilizam glicerol + sacarose + PVS2, e glicerol + sacarose + PVS2 + floroglucinol com porcentagens de germinação de 8,31% e 8,79%, não diferindo estatisticamente da germinação das sementes que não foram criopreservadas (12,50%).

Carneiro (2014) trabalhou com soluções crioprotetoras à base de sacarose, glicerol, PVS2 e floroglucinol sozinhas ou combinadas entre si e com sete espécies diferentes de orquídeas. Para as orquídeas *Cyrtopodium saintlegerianum*, *Cyrtopodium eugenii*, *Epidendrum secundum*, *Epidendrum desciflorum*, *Lockhartia goyazensis* não houve diferença estatística entre a viabilidade inicial quando comparadas às sementes apenas colocadas em criotubos sem adição de nenhuma solução crioprotetora. Para essas espécies, constatou-se que o uso de crioprotetores não se faz necessário. As sementes de *Epidendrum nocturnum* apresentaram redução da viabilidade de até 27% em relação ao inicial, porém não houve diferença estatística entre os tratamentos com crioprotetores e o tratamento sem adição de solução. Em *Cohniella cepula*, a porcentagem inicial de germinação foi de 85,67%. Houve queda na sobrevivência das sementes após a imersão em nitrogênio líquido sem nenhum tratamento, apresentando sobrevivência de 63,62%. Entretanto, nessa espécie foi constatado que soluções crioprotetoras interferem negativamente, pois não houve sobrevivência significativa nos tratamentos que utilizaram os crioprotetores.

Ferrari (2016) também obteve os melhores resultados na criopreservação de *Cattleya labiata* Lindl. e *Miltonia regnelli* Rchb.f. quando não tratadas com crioprotetores. Esses resultados demonstram que cada espécie estudada, mesmo que dentro de um único gênero, devem ser tratadas diferentemente para obter sucesso na recuperação das sementes.

3.2.5. Conclusão

Na criopreservação de sementes em nitrogênio líquido da espécie *Cattleya walkeriana* é necessário o uso de solução crioprotetora, sendo que os tratamentos com PVS2 + 1% e PVS2 +2 % de floroglucinol foram os que resultaram em maior porcentagem de sobrevivência com 84,98% e 84,21%, respectivamente.

3.3. CRIOPROTETORES NA CONSERVAÇÃO EM NITROGÊNIO LÍQUIDO DE POLÍNEAS DA ORQUÍDEA BRASILEIRA *Oncidium baueri* Lindl.

3.3.1. Resumo

O gênero *Oncidium* Sw. é um dos maiores gêneros da família Orchidaceae e é composto por 315 espécies, sendo encontradas 94 nativas no Brasil. O comércio de orquídeas nativas teve como prática o extrativismo que, aliado à destruição de seus habitats, levou à extinção de muitas espécies. A criotecnologia vem se destacando na preservação de espécies vegetais através da criopreservação. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a influência dos crioprotetores na criopreservação em nitrogênio líquido de polínea da orquídea *Oncidium baueri* Lindley. Foram utilizados dois controles e sete tratamentos: C1 - políneas coletadas foram imediatamente utilizadas para polinizar outra flor; C2 - políneas imersas em nitrogênio líquido sem adição de crioprotetores; T1 - glicerol 2M; T2 - glicerol 2M + 0,4M sacarose; T3 - sacarose 0,4 M; T4 - PVS1; T5 - PVS2; T6 - PVS2 + 1% de floroglucinol; T7 - PVS3. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com dois controles sete tratamentos e 10 repetições. Cada repetição foi constituída por 10 flores polinizadas aleatoriamente. As políneas que foram imediatamente utilizadas para fecundar outra flor (C1), apresentaram uma porcentagem de formação de cápsulas de 83%. O tratamento composto por solução de PVS2 (T5) foi o que obteve maior sucesso na recuperação das políneas após o processo de criopreservação (82%), diferindo estatisticamente de todos os outros tratamentos C2, T1, T4, T6 e T7 que apresentaram formação de cápsulas nas frequências de 11%, 3%, 63,0%; 62,0% e 63,0% respectivamente. As políneas dos tratamentos T2 e T3 não sobreviveram a criopreservação. O PVS2 foi a solução mais indicada para a conservação de políneas da orquídea *O. baueri*.

Palavras-chave: Criopreservação, Orchidaceae, pólen, vitrificação.

CRYOPROTECTANTS IN CONSERVATION IN LIQUID NITROGEN OF POLINIA BRASILIAN ORCHID *Oncidium baueri* Lindl.

Abstract

The genus *Oncidium* Sw. Is one of the largest genera of the Orchidaceae family and is composed of 315 species, being found 94 native in Brazil. The trade of native orchids had as a practice the extractivism that, along with the destruction of their habitats, led to the extinction of many species. Cryotechnology has been prominent in the preservation of plant species through cryopreservation. The aim of the present work was to evaluate the influence of cryoprotectants on the cryopreservation in liquid nitrogen of polinias the orchid *Oncidium baueri* Lindley. Two controls and seven treatments were used: C1 - collected polinias were immediately used to pollinate another flower; C2 - polinias immersed in liquid nitrogen without addition of cryoprotectants; T1-glycerol 2M; T2-glycerol 2M + 0.4M sucrose; T3-sucrose 0.4M; T4-PVS1; T5-PVS2; T6-PVS2 + 1% floroglucinol; T7-PVS3. The

experimental design was the completely randomized with two controls seven treatments and ten replicates. Each repetition consisted of ten randomly pollinated flowers. The polinias that were immediately used to fertilize another flower (C1), presented a percentage of capsule formation of 83%. The treatment with PVS2 solution (T5) was the one that obtained the greatest success in the recovery of the polinias after the cryopreservation process (82%), differing statistically from all other treatments C2, T1, T4, T6 and T7 that presented formation of capsules in the frequencies of 11%, 3%, 63.0%; 62.0% and 63.0%, respectively. The polinias of T2 and T3 treatments did not survive cryopreservation. PVS2 was the most suitable solution for the conservation of *O. baueri* orchid polinias.

Keywords: Cryopreservation, Orchidaceae, pollen, vitrification,

3.3.2. Introdução

A família Orchidaceae é considerada um dos maiores grupos de plantas em número de espécies do planeta (CANTUÁRIA et al., 2014). As orquídeas são amplamente difundidas em todo o mundo, representam o maior grupo entre as angiospermas, com 20000 a 35000 espécies. Ocorrem em quase todos os ecossistemas da Terra, com exceção da zona polar, contudo a maior diversidade se apresenta nas regiões tropicais e subtropicais (JOPPA; ROBERTS; PIMM, 2011) e no Brasil, são encontradas cerca de 10% das espécies desse grupo (SOUZA; LORENZI, 2012). Possivelmente, a amplitude geográfica da sua distribuição seja beneficiada pela dissipação a longas distâncias proporcionada por suas numerosas e diminutas sementes.

O gênero *Oncidium* sw. é um dos maiores gêneros da família Orchidaceae e é composto por 315 espécies, sendo encontradas 94 nativas no Brasil, dentre as quais o *Oncidium baueri*, que apresenta grande potencial ornamental em projetos paisagísticos e como flor de corte (FERRAREZI; VIEIRA; FARIA, 2007). Nativo do continente americano, apresenta distribuição dos Estados Unidos à Argentina, com grande expressividade no Brasil, que concentra cerca de 30% das espécies válidas (FARIA; COLOMBO, 2015). O comércio de orquídeas nativas teve como prática o extrativismo que, aliado à destruição de seus habitats naturais pelo avanço da urbanização e agropecuária, levou à extinção ou à quase extinção de muitas espécies (MARTINELLI; MORAES, 2013).

Nos últimos anos, a criotecnologia conquistou grande destaque na preservação de espécies vegetais, com a criopreservação de sementes e outras partes como embriões, pólen, tecidos e células. Sendo essa técnica uma alternativa para a conservação de muitas espécies, em que cada material biológico requer um protocolo específico (SAKAI;

HIRAI; NIINO; 2008). A criopreservação caracteriza-se pela conservação de estruturas vegetais em temperaturas ultrabaixas e tem como princípio básico a finalidade de desacelerar o metabolismo celular, permitindo que sejam conservados por períodos indeterminados, o que possibilita a retomada do desenvolvimento celular normal após o armazenamento em nitrogênio líquido a -196 °C (PEGG, 2007).

As técnicas utilizadas em plantas são controle da taxa de refrigeração, vitrificação, encapsulamento, desidratação e preservação da gema dormente (REED, 2008). Estas técnicas preveem o armazenamento simultâneo de diversas partes da orquídea. Em sementes, técnicas de vitrificação têm mostrado um maior potencial de tolerância ao estresse causado pela criopreservação (MERRITT et al., 2014). No entanto, o sucesso da criopreservação depende de uma delicada e complexa interação entre importantes variáveis, que envolve tanto questões físicas, como o volume da solução de criopreservação e as taxas de resfriamento, quanto questões químicas referentes à composição da solução de criopreservação.

Antes da criopreservação, é de extrema importância a adição de substâncias que proporcionem uma crioproteção celular e tecidual durante a redução da temperatura para a prevenção de injúrias durante e após o descongelamento. Essas substâncias, conhecidas como agentes crioprotetores (ACPs), são fundamentais para resultados satisfatórios. Embora os ACPs sejam necessários e amplamente utilizados nos protocolos de criopreservação, os mecanismos que conferem proteção ao material biológico, bem como a toxicidade e a metabolização celular destes agentes não são completamente esclarecidos e abordados na literatura, principalmente quando se trata de orquídeas.

Vendrame et al. 2014 destacam que em orquídeas técnicas diferentes e adaptadas são utilizadas, incluindo criopreservação de protoplastos, suspensões celulares, calos, gemas apicais e laterais, meristemas, sementes, embriões somáticos e zigóticos. A criopreservação foi relatada para plântulas in vitro de *Dendrobium* (LURSWIJIDJARUS; THAMMASIRI, 2004), sementes de *Dendrobium* Swartz. híbrido 'Dong Yai' e *Oncidium flexuosum* Sims. (GALDIANO JUNIOR et al., 2014) pólen de híbridos de *Dendrobium*, *D.* 'Sena Red', *D.* 'Mini WRL' (VENDRAME, 2008) protocormos de *Dendrobium* Bobby Messina (ANTONY, 2010) e suspensão celular de *Doritaenopsis* (TSUKAZAKI et al., 2000).

O armazenamento de pólen em nitrogênio líquido tem sido considerado por melhoristas como uma forma de aprimoramento dos programas de melhoramento genético

(VENDRAME et al., 2008), pois o pólen é indispensável para a conservação de material genético, pois através dele podem ser feito cruzamentos de plantas com floração em épocas diferentes (ENGELMANN, 2004).

Esses bancos de germoplasma irão simplificar a procura por materiais para os novos cruzamentos e possibilitarão o armazenamento de grande variabilidade genética em pequeno espaço e a custos reduzidos (CARVALHO, 2006). Essa metodologia de conservação permitirá o cruzamento de plantas que florescem em épocas diferentes e plantas que se encontram em locais diferentes e distantes (BAJAJ, 1995)

Apesar da vitrificação ser relatada como um método bem-sucedido para a criopreservação de células, órgãos e tecidos, soluções de vitrificação incluem crioprotetores, que são tóxicos para muitas plantas, o que requer um tratamento cuidadoso (VENDRAME; FARIA, 2011).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a influência do uso de crioprotetores na conservação em nitrogênio líquido de políneas da orquídea brasileira *Oncidium baueri* Lindley.

3.3.3. Material e métodos

O experimento foi conduzido no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Londrina (UEL) - PR, localizada a 23° 23' S e 51° 11' W e altitude média de 566 m no período de novembro de 2015 a maio de 2016. Segundo a classificação de Köppen, o clima da região é do tipo Cfa (subtropical úmido).

O experimento foi mantido em bancadas suspensas em viveiro, protegido com tela de polipropileno de coloração preta, com retenção de 70 % da luminosidade. A irrigação do tipo aspersão foi realizada uma vez ao dia no período da tarde, com duração de 10 min.

A orquídea utilizada neste estudo foi *Oncidium baueri* Lindl. obtida por meio de clonagem *in vitro*. Foram selecionadas plantas em plena floração e coletada as políneas de flores completamente abertas e imediatamente usado na montagem do experimento. Dez políneas foram colocadas em estufa a 105° C por 24 h e, em seguida, o teor de água foi determinado (BRASIL, 2009).

Foram utilizados sete tratamentos e dois controles. No controle 1 (C1) as políneas coletadas de uma flor foram imediatamente utilizadas para polinizar outra flor. No segundo controle (C2), as políneas foram imersas em nitrogênio líquido sem adição de

crioprotetores. Os demais tratamentos consistiram em deixar as políneas em contato com uma das soluções crioprotetoras antes da imersão em nitrogênio líquido: T1 - glicerol 2M; T2 - glicerol 2M + 0,4M sacarose; T3 - sacarose 0,4 M; T4 – PVS1 (Solução de Vitrificação de Plantas 1); T5 - PVS2 (Solução de Vitrificação de Plantas 2); T6 - PVS2 + 1% de floroglucinol (FL); T7 – PVS3 (Solução de Vitrificação de Plantas 3). Para cada tratamento, 10 políneas foram colocadas em criotubos contendo 2 mL de uma das diferentes soluções. T1, T2 e T3 foram expostas às soluções por 20 minutos a temperatura de 25°C. Nos tratamentos T4, T5, T6 e T7 que continham as soluções de PVS, as sementes foram expostas por 10 minutos em banho de gelo (0°C).

A solução de PVS1 foi composta por 19% de glicerol (v/v), 13% de etilenoglicol (v/v), 6% de dimetilsulfóxido – DMSO (v/v) e 0,5M de sorbitol em meio nutritivo MS (URAGAMI et al., 1989). A solução de PVS2 contém 30% de glicerol (v/v), 15% de etilenoglicol (v/v) e 15 % de dimetilsulfóxido – DMSO (v/v) em meio nutritivo MS contendo metade da concentração de sais e sacarose 0,4M (pH 5,7) (SAKAI; KOBAYASHI; OIYAMA, 1990). O PVS3 foi composto por 50% de glicerol (v/v) e 50% de sacarose (v/v) em 100 ml de água destilada (NISHIZAWA et al., 1993).

Os criotubos com os tratamentos foram armazenados em nitrogênio líquido sob temperatura de -196°C durante 48 horas. Após a retirada das sementes do nitrogênio líquido, a recuperação ocorreu por descongelamento em aparelho banho-maria sob temperatura de 40°C durante 1,5 min. As soluções de criopreservação foram removidas dos criotubos e as políneas lavadas com água autoclavada por três vezes em câmara de fluxo laminar.

Em seguida, cada polínea foi utilizada para polinizar uma flor. Para esta etapa do experimento, foram selecionadas plantas com uma semana após a antese. Todas as plantas utilizadas no experimento foram emasculadas antes da polinização artificial, conforme descrito por Faria et al. (2012). Após 180 dias, a sobrevivência das políneas ao processo de criopreservação foi avaliado pela formação de cápsulas e sementes viáveis. Todas as plantas permaneceram em casa de vegetação durante o tempo de condução do experimento.

A porcentagem de sobrevivência das sementes foi obtida através de teste de tetrazólio, realizado colocando-se as sementes em água destilada por um período de 24 horas a 25°C para que ocorresse a hidratação. Em seguida, a água foi retirada e adicionada a solução de tetrazólio a 1%. As sementes permaneceram por 24 horas sob temperatura de 30°C e, com auxílio de uma lupa estereoscópica e o software Motic Images Plus 2.0ML, avaliada a

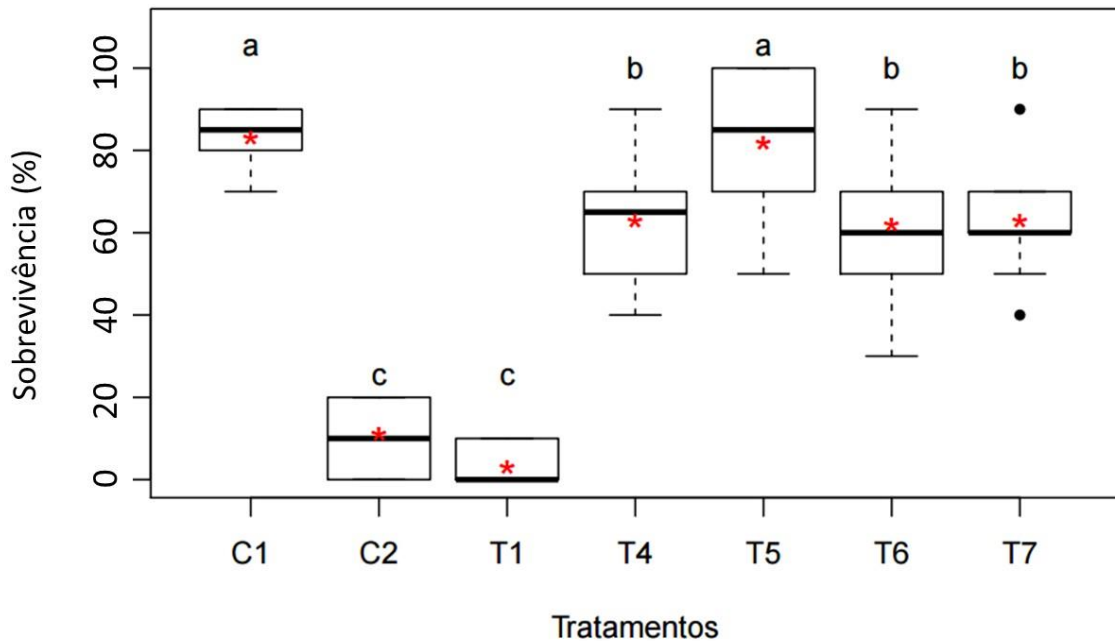
viabilidade. O teor de umidade foi obtido pelo método de estufa a $105\pm 3^{\circ}\text{C}$ conforme especificações das Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com dois controles sete tratamentos e dez repetições. Cada repetição foi constituída por dez flores polinizadas em vasos aleatórios. Os dados de formação de cápsulas foram avaliados por meio de modelos lineares generalizados utilizando a distribuição binomial e posteriormente realizada a análise de variância (ANOVA) e com os pressupostos atendidos os dados foram submetidos a teste Tukey de comparação de médias. Para a porcentagem de sobrevivência das sementes foi utilizado análise de variância e o teste Tukey.

3.3.4. Resultados e discussão

As políneas de *Oncidium baueri* apresentaram teor de umidade inicial de 9,8% antes do tratamento com os crioprotetores. Foi possível verificar a sobrevivência das políneas através do fechamento do estigma e murcha da flor após três dias da polinização. As políneas tratadas com solução de PVS2 (T5) foram as que obtiveram maior sucesso na formação de cápsulas a uma proporção de 0,82 ou 82,0% de sobrevivência, não diferindo estatisticamente do controle 1 (C1) que apresentou 83,0% (Figura 19).

Figura 19: Sobrevivência das políneas de *Oncidium baueri* determinada através da formação de cápsulas após polinização com políneas tratadas com soluções crioprotetoras 180 dias após a polinização.



* C1 - políneas utilizadas imediatamente para polinizar outra flor; C2 - sem crioprotetor; T1 - glicerol 2M; T4 - PVS1; T5 - PVS2; T6 - PVS2 + 1% de floroglucinol; T7 - PVS3. Os tratamentos T2 glicerol 2M + sacarose 0,4M e T3 - sacarose 0,4M, não sobreviveram. Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey. **Fonte:** o próprio autor.

Embora a porcentagem de políneas nos tratamentos T4, T6 e T7 tenha apresentado diferença estatística do controle 1, esses apresentaram 63,0%; 62,0% e 63,0%, de sobrevivência respectivamente. Demonstraram uma alta porcentagem se comparado aos tratamentos C2, T1, T2, T3 com uma porcentagem de sobrevivência de 11,0%; 3,0%; 0,0% e 0,0%. As políneas em T2 e T3 não sobreviveram à criopreservação.

Carvalho (2006) trabalhou com duas cultivares de *Dendrobium*, *D. Sena Red Thailand* e *D. Mini W/RL* submetidos a criopreservação após serem tratadas com solução de PVS2 por 1, 2, 3 e 4 horas e sem solução. Observou que, independente do tratamento, todas as políneas apresentaram alta porcentagem de germinação, apresentando até 80% para *D. Mini W/RL* e 60% para *D. Sena Red Thailand*, não diferindo do controle (sem crioprotetor e sem imersão em nitrogênio líquido). Em *O. baueri* o tratamento que apresentou a maior viabilidade das políneas foi o tratamento com PVS2 diferindo estatisticamente de todas as outras soluções testadas.

Foi observado que os tratamentos que continham a solução de PVS (T4, T5, T6 e T7) obtiveram um maior sucesso na sobrevivência das políneas após o descongelamento,

ao contrário dos demais tratamentos que não possuíam uma solução crioprotetora composta por PVS. Em cultivos comerciais de *D. nobile*, independente do tipo de polinização utilizada, considera-se satisfatória a porcentagem de germinação em torno de 75% (SORGATO et al., 2015).

De acordo com Neves (2008), os crioprotetores intracelulares são responsáveis por proteger as organelas celulares durante o resfriamento, podendo atravessar as membranas celulares com relativa facilidade. Glicerol, DMSO e etilenoglicol estão entre os mais comumente utilizados. Os crioprotetores extracelulares são as macromoléculas e açúcares com alto peso molecular, por exemplo a sacarose, cuja função é reduzir a formação de gelo e facilitar a desidratação das células e proteger a membrana celular.

A solução de PVS2 que obteve a maior porcentagem de sobrevivência é composta por uma mistura de crioprotetores intracelulares e extracelulares. Essa solução é descrita por diversos autores como eficiente para a criopreservação de sementes. O sucesso na criopreservação depende dos níveis de tolerância à desidratação e ao congelamento (FERRARI, 2016).

Kasai et al. (1996) e Vajta (2000) destacam que, para minimizar as injúrias sofridas pela célula, a combinação dos crioprotetores intra e extracelulares tem se mostrado eficiente. O PVS2 é utilizado em protocolos de vitrificação. A solução faz com que a água passe do estado líquido para um estado sólido amorfo metaestável, ou seja, não há formação de cristais de gelo que, ao descongelar, causam a ruptura do sistema de membranas celulares.

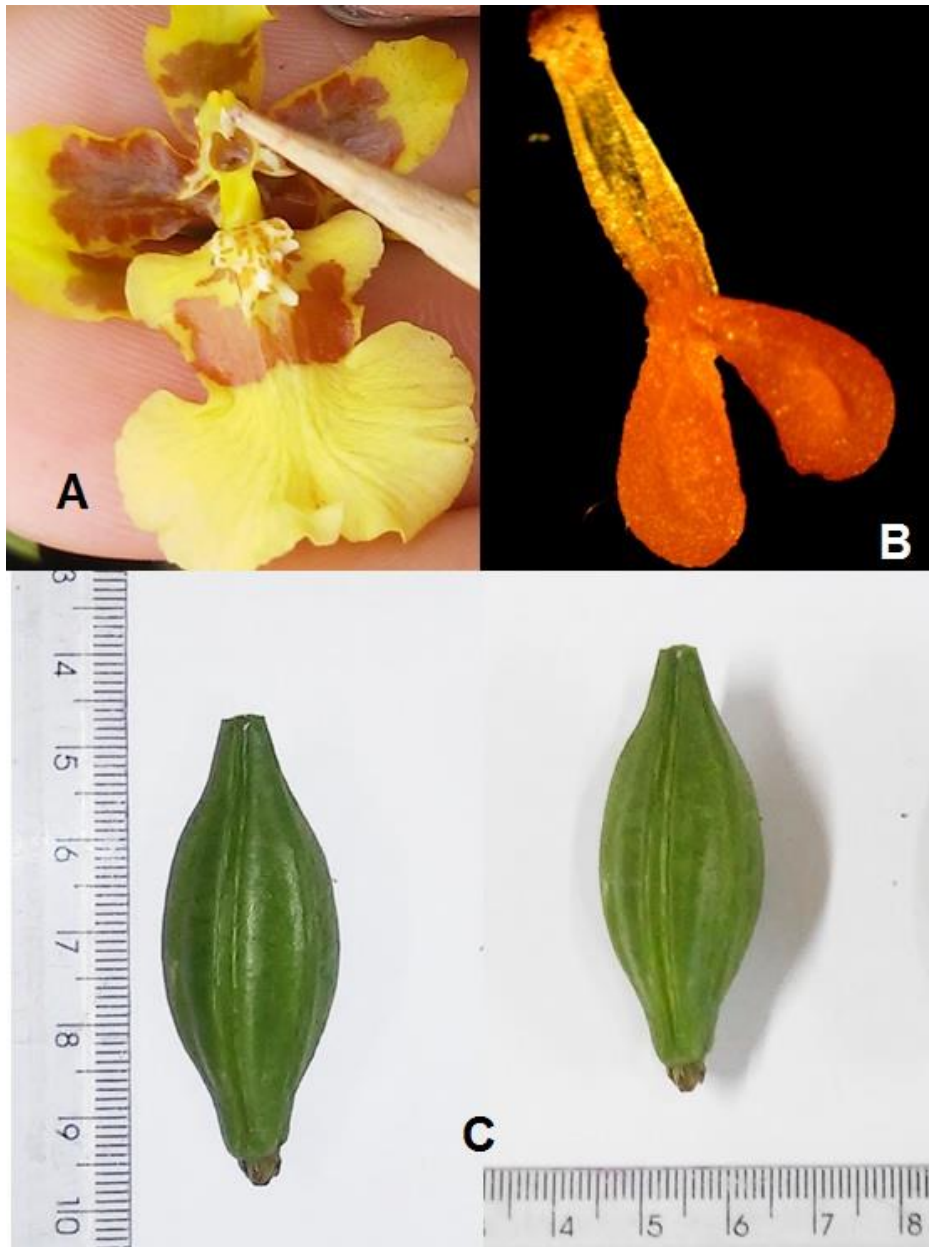
Em *O. baueri* é possível afirmar que as concentrações dos componentes utilizados nas soluções foram significativas para os resultados obtidos. Nos tratamentos T1, T2 e T3 em que as concentrações de glicerol eram de 2M, sacarose 0,4M, não houve sucesso na recuperação da semente após o descongelamento. No tratamento T7 (PVS3), que também é composto por glicerol e sacarose em concentração mais elevada 5,4M e 1,5M, respectivamente, as políneas obtiveram uma maior porcentagem de germinação quando comparado a esses tratamentos; (T1, T2 e T3).

Segundo Kasai et al., (1996) o glicerol assim como a sacarose possuem baixa toxicidade, o que descarta a hipótese dos crioprotetores terem sido tóxicos para as políneas e reforça que a baixa concentração do composto permitiu que as células não perdessem a quantidade necessária de água.

Todas as cápsulas foram colhidas na mesma época (Figura 20). As cápsulas de *O. baueri* formadas eram ovaladas, sem presença de doenças ou injúrias causadas por

pragas, de coloração homogênea verde clara e estavam fechadas. Possuíam $5,2\pm 0,3$ cm comprimento e $1,9\pm 0,2$ cm de diâmetro.

Figura 20: A - Detalhe da flor e da polínea; B - Foto com lupa estereoscópica da polínea de orquídea *Oncidium baueri*; C - Cápsulas formadas após polinização com políneas criopreservadas após 180 dias.

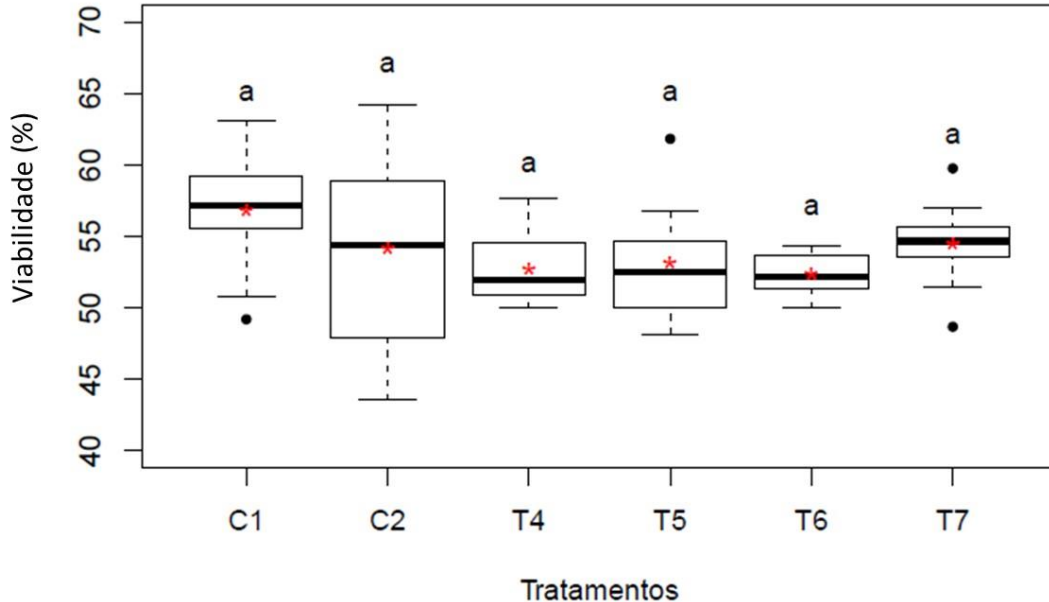


Fonte: o próprio autor

As sementes de cápsulas formadas de flores polinizadas com as políneas tratados com as diferentes soluções crioprotetoras não demonstraram diferença estatística

significativa entre si em sua viabilidade. As cápsulas formadas no tratamento T1 foram abortadas pelas plantas (Figura 21).

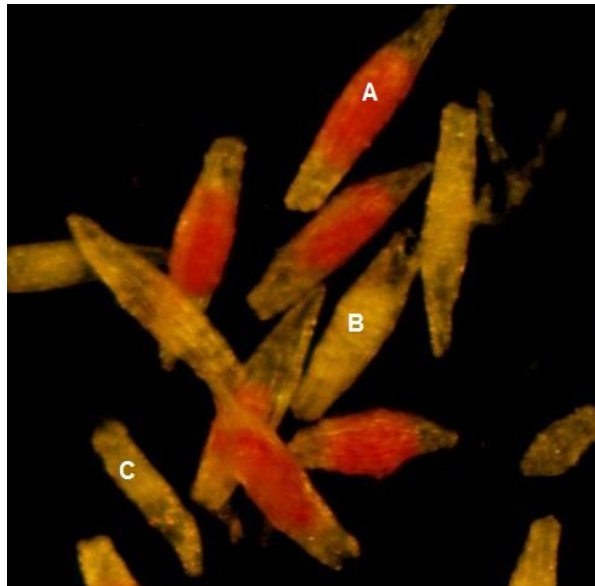
Figura 21: Viabilidade das sementes de cápsulas formadas por polinização artificial com políneas tratadas com soluções crioprotetoras*.



* C1 - políneas utilizadas imediatamente para polinizar outra flor; C2 - sem crioprotetor; T4 - PVS1; T5 - PVS2; T6 - PVS2 + 1% de floroglucinol; T7 - PVS3. Os tratamentos T1 - glicerol 2M; T2 - glicerol 2M + sacarose 0,4M; T3 - sacarose 0,4 M; não sobreviveram. Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey. **Fonte:** o próprio autor.

As sementes, quando observadas em lupa estereoscópica, continham embriões bem formados e foi possível avaliar a viabilidade pela coloração vermelha obtida através do teste de tetrazólio (Figura 22). O teor de umidade foi de 5,12% anteriormente ao teste.

Figura 22: Sobrevivência dos embriões de sementes de cápsulas formadas por políneas tratadas com PVS2 submetidos a criopreservação determinada através de teste tetrazólio. A – Embriões viáveis. B – Embriões inviáveis. C – Sementes vazias.



Fonte: o próprio autor.

O armazenamento de pólen é similar ao de sementes. A qualidade do pólen é essencial, pois grãos de pólen coletados de anteras muito novas ou velhas não sobrevivem bem ao armazenamento. Plantas estressadas produzem pólen com baixa fertilidade. A armazenagem de políneas bem como o de sementes necessitam de pouco espaço e preserva grandes quantidades de material genético (TOWILL, 2002).

3.3.5. Conclusão

Para a criopreservação em nitrogênio líquido de políneas da espécie *O. baueri*, faz-se necessário o uso de crioprotetores para que ocorra a formação de cápsulas e produção de sementes. O PVS2 utilizado isoladamente proporcionou sobrevivência de 82,0%, portanto indicada para a conservação dessa espécie.

4. CONCLUSÕES GERAIS

Para o sucesso da criopreservação em nitrogênio líquido de sementes das orquídeas *Catasetum atratum* e *Cattleya walkeriana* e de políneas de *Oncidium baueri* é necessário a utilização de crioprotetores.

O melhor tratamento para sementes de *C. atratum* foi o PVS2 isoladamente com 67,70% de sobrevivência e com plântulas dentro dos parâmetros de normalidade com proporções adequadas de parte aérea e raiz.

Para *C.walkeriana* os melhores tratamentos foram PVS2 + 1% e PVS2 + 2% de floroglucinol, apresentado porcentagens de sobrevivência de 84,98% e 84,21%, respectivamente. O floroglucinol acrescentado a solução de PVS2 foi um suprimento importante com elevado taxa de recuperação das sementes, visto que apenas o PVS2 isoladamente quando aplicado as sementes apresentou taxa de sobrevivência de 74,31%.

Para a criopreservação de políneas de *O. baueri* a mais alta sobrevivência foi observada no tratamento com PVS2 utilizado isoladamente com 82%, entretanto, nos tratamentos com PVS1, PVS2 + 1% de floroglucinol e PVS3 obtiveram taxa de fecundação de 63%, 62% e 63%, nessa ordem, sugerindo um potência das substâncias para criopreservação em orquídeas.

REFERÊNCIAS

ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP. Disponível em:

<<http://www.mobot.org/mobot/research/apweb/>> Acesso em 12 jun. 2016.

ANTONY, J.J.; KENG, C.L.; RATHINAM, X.; MARIMITHU, S.; SUBRAMANIAM, S. Preliminary study on cryopreservation of *Dendrobium Bobby* Messina protocorm-like bodies by vitrification. **African Journal of Biotechnology**, v.9, n.42, p.7063-7070. 2010.

ARIGITA, L.; GONZALEZ, A.; TAMÉS, R.S. Influence of CO₂ and sucrose on photosynthesis and transpiration of *Actinia deliciosa* explants cultured in vitro. **Physiologia Plantarum**, v.115, p.166-173, 2002.

BAJAJ, Y.P.S. Cryopreservation of plant cell, tissue, and organ culture for the conservation of germplasm and biodiversity. In: BAJAJ, Y.P.S. (Ed.) **Biotechnology in Agriculture and Forestry**. Berlin: Springer, 1995. p. 3-28.

BENZING, D.H. Why is Orchidaceae so large, its seeds so small, and its seedlings mycotrophic? **Selbyana**, v.5, n. 3-4, p. 241-242. 1981.

BARBEDO, C.J.; MARCOS FILHO, J. Tolerância à dessecação em sementes. **Acta Botanica Brasilica**, v.12, n. 2, p.145-164, 1998.

BATISTA, P.S. **Análise de efeito do spray de nitrogênio líquido em culturas de bactérias *Enterococcus faecalis* – Estudo in Vitro**. 2006. 97f. Tese (Doutorado em Odontologia). Porto Alegre, 2006.

BARBOSA, J.F.; SANVITTO, L.C. Crioterapia Local (Criocirurgia) – Denominação e Histórico. **Boletim de Oncologia**, v.3, n.3-4, p.29-34, 1973.

BARROS, F.; VINHOS, F.; RODRIGUES, V.T.; BARBACENA, F.F.V.A.; FRAGA, C.N.; PESSOA, E.M.; FORSTER, W.; MENINI NETO, L.; FURTADO, S.G.; NARDY, C.; AZEVEDO, C.O.; GUIMARÃES, L.R.S. 2015. **Orchidaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro.
<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB11312>. Acesso: 06 jun. 2016.

BENSON, E.E.; JOHNSTON, J.; MUTHUSAMY, J.; HARDING, K. Physical and engineering perspectives of in vitro plant cryopreservation. **Plant tissue culture engineering**, v.6, p. 441- 476. 2008.

BLOSSFELD, A. **Orquidologia, Orquidofilia e Orquidicultura**. Jaboticabal: Funep, 1999. p. 4-17.

BOWLING, J.C.; THOMPSON, P.A. On storing orchid seed. **Orchid Review**, v.80, p.120-121, 1972.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 2009. 399p.

CAMPOS, D.M. **Orquídeas: Manual prático de cultura**. 2ed. Rio de Janeiro: Expressão e Cultura, 2001. 143p.

CAMPOS, D.M. **Orquídeas: Manual prático de reprodução**. 2ed. Rio de Janeiro: Expressão e Cultura, 2002. 128p.

CANTUÁRIA, P.C.; FREITAS, J.L.; SILVA, R.B.L.; CANTUÁRIA, M.F. Percepção ambiental da Família Orchidaceae em sistemas agroflorestais de agricultores familiares no Igarapé Mutuacá, Mazagão, Amapá, Brasil. **Biota Amazônia**. v.4, p.119-124. 2014.

CARNEIRO, L. L. **Pré-melhoramento genético, floração *in vitro* e criopreservação de orquídeas nativas do cerrado**. 2014. 93f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia. 2014.

CARVALHO, V.S. **Criopreservação de Sementes e pólen de Orquídeas**. 2006. 82 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

CASTRO, R.D; BRADFORD, K.J.; HILHORST, H.W. Desenvolvimento de sementes e conteúdo de água In: **Germinação. Do básico ao aplicado**. Artmed Editora, 2004. p.51-67.

CATRACA LIVRE. Disponível em: <https://catracalivre.com.br/bh/agenda/barato/inhotim-inaugura-largo-das-orquideas>. Acesso em: 15 de mar. 2017

CHEN, Y.; LIU, Y.; JIANG, J.; ZHANG, Y.; YIN, B. Dendronone, a new phenanthrenequinone from *Dendrobium cariniferum*. **Food Chemistry**, v.111, n.1, p.11–12, 2008.

CONSELHO NACIONAL DE CONSERVAÇÃO DA FLORA - CNCFlora. **Informações da avaliação de risco de extinção**. Disponível em: <<http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Catasetum%20atratum>>. Acesso em: 15 Jan. 2017.

DALIMATA, A.M., GRAHAM, J.K. Criopreservation of rabbit spermatozoa using acetamide in combination with trehalose and methyl cellulose. **Theriogenology**, v.48, p.831-841, 1997.

DAMIÃO FILHO, C. F. Morfolgoia Vegetal. 2 ed. Jaboticabal: Funep, 2005. 175 p.

DAY, J.G; HARDING, K.C.; NADARANJAN, J.; BENSON, E.E. **Molecular biomethods handbook: conservation of bioresources at ultra low temperatures**. UK: Humana Press. p. 917 –947. 2008.

DEMIRALAY, A.; YALCIN-MENDI, Y.; AKA-ACAR, Y.; CETINER, S.; AKSOY, U.; FERGUNSON, L.; HEPKSOY, S. *In vitro* propagation of *Ficus carica* L. var. Bursa Siyahithrough- out meristemculture. **Acta Horticulturae**, n.480, p.165–167. 1998.

DENNISTON, R.S.; MICHEKET, S.; GODKE, R.A. Principles of cryopreservation. In. TIERSCH, T.R.; MAZIK, P.M. **Cryopreservation in aquatic species**. **World Aquaculture Society**, 2000. p. 59-74.

DEREUDRE, J.; SCOTTEZ, C.; ARNAUD, Y.; DURON, M. Résistance d'apex caulinaires de vitro-plants de Poirier (*Pyrus communis* L. cv. Beurré Hardy), enrobés dans l'alginat, à une déshydratation puis à une congélation dans l'azote liquide: Effet d'un endurcissement préalable au froid. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences**, v.3. p. 317-323, 1990.

- DUMET, D.; ENGELMANN, F.; CHABRILLANGE, N.; DUVAL, Y.; DEREUDDRE, J. Importance of sucrose for the acquisition of tolerance to desiccation and cryopreservation of oil palm somatic embryos. **Cryo-Letters**, v.14, p.243-250. 1993.
- DRESSLER, R. L. **Phylogeny and classification of the orchid family**. Portland: Dioscorides Press, 1993. 321p.
- DRESSLER, R.L. How many orchid species?, **Selbyana**, v.26, p.155-158, 2005.
- ENGELMANN, F. Importance of desiccation for the cryopreservation of recalcitrant seed and vegetatively propagated species. **Plant Genetic Resources Newsletter**, v.112, p.9-18, 1997.
- ENGELMANN, F. Plant cryopreservation: progress and prospects. In: Vitro Cellular and Developmental. **Biology-Plant**, v.40, n.5, p.427-433. 2004.
- ENGELMANN, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. **In Vitro Cellular and Development Biology -Plant**, v.47, p.5-16, 2011.
- FABIÁN, A.; JÄGER, K.; DARKÓ, E.; BARNABÁS, B. Cryopreservation of wheat (*Triticum aestivum* L.) egg cells by vitrification. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.30, 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.
- FAN, C.; WANG, W.; WANG, Y.; QIN, G.; ZHAO, W. Chemical constituents from *Dendrobium densiflorum*. **Phytochemistry**, v.57, n.8, p.1255–1258, 2001.
- FARIA, R.T.; DALIO, R.J.D.; UNEMOTO, L.K.; SILVA, G.L. Propagação *in vitro* de *Oncidium baueri* Lindl. (Orchidaceae) sem uso de ágar. **Acta Scientiarum**, v.28, n.1, p.71-74, 2006.
- FARIA, R.T.; ASSIS, A.M.; CARVALHO, J.F.R.P. **Cultivo de Orquídeas**. Londrina: Mecenas, 2010. 208p.
- FARIA, R.T.; ASSIS, A.M.; UNEMOTO, L.K.; CARVALHO, J.F.R.P. **Produção de Orquídeas em Laboratório**. Londrina: Mecenas, 2012. 124p.
- FARIA, R.T.; COLOMBO, R.C. *Oncidium*: a orquídea em expansão no cenário florícola. **Horticultura brasileira**. v. 3. p.1 – 2. 2015.
- FARIA, R.T.; COLOMBO, R.C.; OLIVEIRA, L.V.R.; CAMOLESI, M.R. **Orquídeas do Gênero *Catasetum* no Brasil**. Londrina: Mecenas, 2016. 160p.
- FERRAREZI, E.; VIEIRA, A.O.S.; FARIA, R.T. **Orquídeas: o gênero *Oncidium* no Paraná**. Londrina: EDUEL, 2007. 120 p.
- FERRARI, E.A.P. **Criopreservação de Sementes de Orquídeas Brasileiras**. 2016. 71 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

FERREIRA, L.S. **Cultivo *in vitro* de orquídeas em dois ambientes (Sala de crescimento e casa de vegetação): crescimento e capacidade fotossintética.** 2014. 81f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes. 2014.

GALDIANO JUNIOR, R.F.; LEMOS, E.G.M.; FARIA, R.T.; VENDRAME, W.A. Cryopreservation of *Dendrobium* hybrid seeds and protocorms as affected by phloroglucinol and Supercool X1000. **Scientia Horticulturae**, v.148, p.154-160, 2012.

GALDIANO JUNIOR, R.F. **Criopreservação, indução de poliploidia e avaliação da estabilidade genética de orquídeas.** 2013. 82f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2013.

GALDIANO JUNIOR, R.F.; LEMOS, E.G.M.; FARIA, R.T.; VENDRAME, W.A. Seedling Development and Evaluation of Genetic Stability of Cryopreserved *Dendrobium* Hybrid Mature Seeds. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.172, p.2521–2529. 2014.

GOLÇALVES, E.G.; LORENZI, H. **Morfologia Vegetal: Organografia e Dicionário Ilustrado de Morfologia das Plantas Vasculares.** 2 ed. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2011. 546 p.

GONZÁLEZ-BENITO, E.M., PÉREZ-GARCÍA F. Cryopreservation of lipid-rich seeds: effect of moisture content and cooling rate on germination. **Cryo Letters**. v.22, n.2, p. 135-140. 2001.

GOVAERTS, R.; PFAHL, J.; CAMPACCI, M.A.; HOLLAND BAPTISTA, D.; TIGGES, H.; SHAW, J.; CRIBB, P.; GEORGE, A.; KREUZ, K.; WOOD, J. **World checklist of Orchidaceae. The Board of Trustees of the Royal Botanic Gardens, Kew.** 2014. Disponível em <<http://apps.kew.org/wcsp/>>. Acesso em 9 mar 2016.

HAMMATT, N. Promotion by phloroglucinol of adventitious root formation in micropropagated shoots of adult wild cherry (*Prunus avium* L.) **Plant Growth Regulation**, n.14, p.127-132. 1994.

HIRANO, T.; GODO, T.; MIYOSHI, K.; ISHIKAWA, K.; ISHIKAWA, M.; MII, M., Cryopreservation and low-temperature storage of seeds of *Phaius tankervilleae*. **Plant Biotechnology Reports**, v.3, p.103-109, 2009.

HOLST, A.W. **The world of Catasetum. Timber.** Oregon: Humana Press Inc, 1999. 306 p.

HONG, T.D.; ELLIS, R.H. **A protocol to determine seed storage behaviour.** Roma: International Plant Genetic Resources Institute, 1996. 55p.

HOSOMI, S.T. **Germinação, viabilidade e armazenamento de sementes de *Cattleya* (Ochidaceae).** 2009. 61 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente. 2009.

IBRAFLOR. Instituto Brasileiro de Floricultura: **Números do setor.** Disponível em: <<http://www.ibraflor.com/publicacoes/vw.php?cod=213>> Acesso em: 12 jun. 2016.

- ISHIKAWA, K. et al. Cry-opreservation of zygotic embryos of a Japanese terrestrial orchid (*Bletilla striata*) by vitrification. **Plant Cell Reports**, v.16, p.754–757, 1997.
- JORDÃO, L.R.; LOPES, V.B.; TAKAKI, M. Selection of viable seeds in *Hormidium coriaceum* Ldl. (Orchidaceae) by density separation. **Seed Science and Technology**, v.16, p. 515-19. 1988.
- JOPPA, L.N.; ROBERTS, D.L.; PIMM, S.L. How many species of flowering plants are there? **Proceedings of the Royal Society - Biological Sciences**, v.278, p. 554–559. 2011.
- JUDD, W.S.; STEVENS, P.F.; KELLOG, E.A.; DONOGHUE, M.J.; CAMPBELL, C.S. **Sistemática vegetal: um enfoque filogenético**. 3.ed. Porto Alegre. 2009. 632 p.
- JUNGHANS, T.G.; SOUZA, A.S. **Aspectos práticos da micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2009. 385p
- KASAI, M. Simple and efficient methods for vitrification of mammalian embryos. **Animal Reproduction Science**, v.42, p.67-75. 1996.
- KÄMPF, A. N. A floricultura brasileira em números. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 3, p.1-7, 1997.
- KANG, K.A.; LEE, K.H.; CHAE, S.; ZHANG, R.; JUNG, M.S.; HAM, Y.M.; BAIK, J.S.; HYUN, J.W. Cytoprotective effect of phloroglucinol on oxidative stress induced cell damage via catalase activation. **Journal of Cellular Biochemistry**, n.97, p.609–620. 2006.
- KERBAUY, G.B. **Fisiologia Vegetal**. 2 ed. Guanabara Koogan, 2008. 472p
- KERSTEN, R.A.; SILVA, S.M. Composição florística e estrutura do componente epifítico vascular em floresta da planície litorânea na Ilha do Mel, Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v.24, p.213-226. 2001.
- KIM, M.M.; KIM, S.K. Effect of phloroglucinol on oxidative stress and inflammation. **Food and Chemical Toxicology**, n.48, p.2925–2933. 2010
- KNUDSON, L. Non-symbiotic germination of orchid seed. **Botanical Gazette**, v.73, p.1-25. 1922.
- KOYASHIKI, R. Orquídea nativa do Paraná tem potencial contra o câncer. **Jornal da UEM**, n.115, maio 2014. Disponível em: <http://www.jornal.uem.br/2011/index.php?option=com_content&view=article&id=856:orquidea-nativa-do-parana-tem-potencial-contra-o-cancer&catid=93:jornal-107-outubro2012&Itemid=31>. Acesso em: 03 de jul. 2016.
- LATTA, R. Preservation of suspension cultures of plant cells by freezing. **Canadian Journal of Botany**. v.49, p.1253-1254. 1971.
- LAUZER, D.; ST-ARNAUD, M.; BARABÉ, D. Tetrazolium staining and in vitro germination of mature seeds of *Cypripedium acaule* (Orchidaceae). **Lindleyana**, v.9, n.3, p. 197-204, 1994.

LONE, A.B.; TAKAHASHI, L.S.A.; FARIA, R.T.; ASSIS, A.M.; UNEMOTO, L.K. Desenvolvimento vegetativo de orquídeas submetidas a diferentes formulações de macronutrientes e frequências de adubação durante a fase de aclimatização. **Semina: Ciências Agrárias**, v.31, n.4, p. 895-900. 2010.

LUSORQUIDEAS. Disponível em: <http://www.lusorquideas.com/catasetum.html>. Acesso em: 15 de mar. 2017.

LURSWIJIDJARUS, W.; THAMMASIRI, K. Cryopreservation of shoot tips of *Dendrobium Walter Oumae* by encapsulation/dehydration. **Science Asia Journal**, v.30, p.293–299. 2004.

MACHADO NETO, N.B.; CUSTODIO, C.C. Orchid conservation through seed banking: ins and outs. **Selbyana**, v.26, p.229-235, 2005.

MACHNICKI-REIS, M.; ENGELS, M.E.; PETINI-BENELLI, A.; SMIDT, E.C.O gênero *Catasetum* Rich. ex Kunth (Orchidaceae, Catasetinae) no Estado do Paraná, Brasil. **Hoehnea**, v.42, n.1, p. 185-194, 2015.

MARTINI, C.M.; WILLADINO, L.; ALVES, G.D.; DONATO, V.M.T.S. Propagação de orquídea *Gongora quinquinervis* por sementeira in vitro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, n.10, p.1319-1324, 2001.

MARTINELLI, G.; MORAES, M.A. **Livro vermelho da flora do Brasil**. 1.ed. - Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2013. 1100 p.

MARTINO, A.; POLLARD, J.A.; LEIBO, S.P. Effect of chilling bovine oocytes on their developmental competence. **Molecular Reproduction Development**, v.45, p.503-512, 1996.

MAZUR, P. Fundamental aspects of the freezing of cells, with emphasis on mammalian ova and embryos. In: **INTERNATIONAL CONGRESS ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION**. Proceedings. v.2, P. 99-114. 1980.

MERRITT, D.J.; HAY, R.F.; SWARTS, N.D.; SOMMERVILLE, K.D. & DIXON, K.W. *Ex situ* Conservation and Cryopreservation of Orchid Germplasm. **International Journal of Plant Sciences**, v.175, n. 1, Special Section: *Ex Situ* Plant Conservation and Cryopreservation, p. 46-58. 2014.

MEEYOT, W.; KAMEMOTO, H. Studies on storage of orchid pollen. **The American Orchid Society**. v.38, p. 388-393, 1969.

MURASHIGE, T; SKOOG, F.A. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plant**, v.15, p. 473-479, 1962.

NERY, M.C.; DAVIDE, A.C.; SILVA, E.A.A.; SOARES, G.C.M.; NERY, F.C. Classificação fisiológica de sementes florestais quanto a tolerância à dessecação e ao armazenamento. **Cerne**. v.20, n.3, p.477-483, 2014.

NEVES, P.R. **Utilização de Crioprotetores Intra e Extracelulares em embriões de Pacu (*Piaractus mesopotamicus*)**. 2008. 87f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá. 2008.

NEVES, M.F.; PINTO, M.J.A. **Mapeamento e Quantificação da Cadeia Produtiva de Flores e Plantas Ornamentais no Brasil.** – São Paulo: OCESP, 2015. 132p.

NIEMANN, H. Cryopreservation of ova and embryos from livestock: current status and research needs. **Theriogenology**, v.35, p.109-124, 1991.

NISHIZAWA, S.; SAKAI, A.; AMANO, Y.; MATSUZAWA, T. Cryopreservation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) embryogenic suspension cells and subsequent plant regeneration by vitrification. **Plant Science**, v.91, p.67-73, 1993.

NIKISHINA, T.V.; POPOV, A.S.; KOLOMEITSEVA, G.L.; GOLOVKIN, B.N. Effect of cryopreservation on seed germination of rare tropical orchids. **Russian Journal of Plant Physiology**, v.48, p.810-815, 2001.

NIKISHIMA, T.V.; POPOVA, E.V.; VAKHAMEEVA, M.G.; VARLYGINA, T.L.; KOLOMEITSEVA, G.L.; BUROV, A.V.; POPOVICH, E.A.; SHIROKOV, A.I.; SHUMILOV, V.Y.U.; POPOV, A.S. Cryopreservation of seeds and protocorms of rare temperate orchids. **Russian Journal of Plant Physiology**, v.54, p.121-127, 2007.

OLIVEIRA, A. A. P.; BRAINER, M. S. C. P. **Floricultura: Caracterização e Mercado.** Banco do Nordeste do Brasil; série Documentos do Escritório Técnico de Estudos Econômicos do Nordeste – ETENE, Fortaleza, 2007.

PABST, G.F.J.; DUNGS, F. **Orchidaceae brasiliensis**, v.1. Kurt Schmiersow: Hildesheim. 1975.

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

PEREZ-GARCIA, F. GONZÁLES-BENITO, M.E. Seed cryopreservation of *Halimium* and *Helianthemum* species. **Cryo Letters**, v.29, p.271-276. 2008.

PILATTI, F. K.; AGUIAR, T.; SIMÕES, T.; BENSON, E. E.; VIANA, A. M. **In vitro and cryogenic preservation of plant biodiversity in Brazil.** In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant. Chesterfield, v. 47, n.1, p. 82–98, 2010.

PIÑA-RODRIGUES, F. C.; FIGLIOLIA, M. B.; PEIXOTO, M. C. Teste de qualidade. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. (Org.). **Germinação – do básico ao aplicado.** Porto Alegre: Artmed, 2004. p.283- 297.

PRIDGEON, A.M., CRIBB, P.J., CHASE, M.W. & RASMUSSEN, F.N. **Genera orchidacearum** v. 5. Epidendroideae (Part II). Oxford University Press Inc., Oxford. 2009.

PRITCHARD, H.W., Liquid nitrogen preservation of terrestrial and epiphytic orchid seed. **Cryo-Letters**, v.5, p.295–300, 1984.

PRITCHARD, H.W.; POYNTER, A.L.C.; SEATON, P.T., Interspecific variation in orchid seed longevity in relation to ultra-dry storage and cryopreservation. **Lindleyana** v.14, p.92–101. 1999.

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

REED, B.M., Cryopreservation – practical considerations. In: REED, B.M. (Ed.), **Plant Cryopreservation: A Practical Guide**. Springer, New York, 2008. p. 3–14.

REFLORA. **Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>. Acesso em: 12 Jun. 2016

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

RODRIGUES, V.T. **Orchidaceae Juss. aspectos morfológicos e taxonômicos**. 2011. Disponível em:

<http://www.biodiversidade.pgibt.ibot.sp.gov.br/Web/pdf/Orchidaceae_Juss_Aspectos_Morfológicos_e_Taxonômicos_Vinicius_Trettel_Rodrigues.pdf> Acesso em: 24 de jun. 2016.

ROMERO, G.A. Non-functional flowers in Catasetum orchids (Catasetinae, Orchidaceae). **Botanical Journal of Linnean Society**, v. 109, p. 305-313. 1992.

SAKAI, A.; Survival of the twig of woody plants at -196°C . **Nature**, v. 185, p. 392-394, 1960.

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

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

SAKAI, A.; HIRAI, D.; NIINO, T. Development of PVS-Based vitrification and encapsulation-vitrification protocols. In: Reed, B. M. **Plant Cryopreservation: a practical guide**. Corvallis: Springer, p. 33-58. 2008.

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

SANTOS, I.R.I.; SALOMÃO, A.N. **Manual de curadores de germoplasma – Vegetal: Criopreservação**. Documento 319. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Brasília, 2010.

SARKAR, D.; NAIK, P.S. Phloroglucinol enhances growth and rate of axillary shoot proliferation in potato shoot tip cultures in vitro. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, n.60, p.139–149. 2000.

SHARIFIAN, S.; VAHDATI, K.; MIRMASOUMI, M.; GHAEMMAGHAMI, S.A.; Assessment of phloroglucinol effect on rooting of tissue cultured Persian walnut. **Acta Horticulturae**, n.812, p.189–195. 2009.

SEATON, P.T.; HAILES, S.J. Effect of temperature and moisture content on the viability of *Cattleya aurantiaca* seed. In: PRITCHARD, H.W. **Modern methods in orchid conservation: the role of physiology, ecology and management**. Cambridge, Cambridge University Press, UK, 1989. p. 17-29.

SEATON, P. T.; PRITCHARD, H. W. **Recent development in orchid seed banking.** Proceedings of the World Orchid Conference, Vancouver, 1999. p. 390 -396.

SHIAU, Y.J., SAGARE, A.P., CHEN, U.C., YANG, S.R., TSAY, H.S. Conservation of *Anoectochilus formosanus* Hayata by artificial cross-pollination and in vitro culture of seeds. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v. 43, p. 123-130, 2002.

SIMIONE, F.P. **Thermo Scientific Nalgene and Nunc Cryopreservation Guide.** 2013. Disponível em: <http://www.atcc.org/~media/PDFs/Cryopreservation_Technical_Manual.ashx>. Acesso em: 01 jul 2014.

SINGH, F. Differential staining of orchid seeds for viability testing. **American Orchid Society Bulletin**, v.50, p. 416-18, 1981.

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

SORGATO, J.C.; SOARES, J.S.; PINTO, J.V.C.; ROSA, Y.B.C. Potencial germinativo de sementes e qualidade de keikis de *Dendrobium nobile* em diferentes fases do desenvolvimento dos frutos. **Ciência Rural**, v.45, n.11, p. 1965-1971. 2015.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática - Guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil**, baseado em APG III. 3.ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantaru. 2012. 768p.

SOUZA, V.C.; FLORES, T..B.; LORENZI, H. **Introdução à Botânica: Morfologia.** São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2013. 224 p.

SOUZA, G.R.B. **Desenvolvimento *in vitro* e criopreservação de sementes de orquídeas.** 2015. 64 f. Tese (Doutorado em Agronomia). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 2015.

STANWOOD, P.C.; BASS, L.N. Seed germplasm preservation using liquid nitrogen. **Seed Science and Technology**, v.9, p.423-437, 1981.

STANWOOD, P.C. Cryopreservation of seed germplasm for genetic conservation. In: **Cryopreservation of plant cell and organs.** Boca Raton, Flórida: CRC, 1985. p. 199-236.

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

SURENCISKI, M.R. et al. Cryopreservation of *Cyrtopodium hatschbachii* Pabst (Orchidaceae) immature seeds by encapsulation-dehydration. **Biocell**, v.36, n.1, p.31-36. 2012.

SUZUKI, A.B.P.; ALVES, G.A.C. VIDAL, T.C.M.; FARIA, R.T. Criopreservação de Sementes de Orquídea *Arundina bambusifolia*. In: II SIMPOSIO BRASILEIRO SOBRE

CULTIVO DE ORQUIDEA, 2015, Jaboticabal. **Anais...** . Jaboticabal: Unesp, 2015. p.31 - 35.

TAKANE, R. J.; YANAGIZAWA, S. S. **Cultivo moderno de orquídeas: Phalaenopsis**. São Paulo, Editora Associação João Meinberg de Ensino de São Paulo. 2007. 130 p.

TAKANE RJ; YANAGISAWA SS; PIVETTA KFL. **Cultivo moderno de orquídeas: Cattleya e seus híbridos**. Fortaleza: UFC. 2010. 179p.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 722 p.

TOWILL, L.E. Cryopreservation of plant germplasm. *In*: Towill, L.E.; Bajaj, Y.P.S. eds. Cryopreservation of plant germplasm II. **Biotechnology in Agriculture and Forestry**, v.50, p.04-21. 2002.

TSUKAZAKI, H.; MII, M.; TOKUHARA, K.; ISHIKAWA, K. Cryopreservation of *Doritaenopsis* suspension culture by vitrification. **Plant Cell Report**, v.19, p.1160–1164. 2000.

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

VAJTA, G.; HOLM, P.; KUWAYAMA, M. et al. Open pulled straw (OPS) vitrification: A new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v.51, p. 53-58, 1998.

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

VAJTA, G.; KUWAYAMA, M.; VANDERZWALMWN, P. Disadvantages and benefits of vitrification. *In*: **Vitrification in assisted reproduction a user's manual and troubleshooting guide**. London: Informa UK, 2007. p.33-44.

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

VENDRAME, W. A.; CARVALHO, V. S.; DIAS, J. M. M. In vitro germination and seedling development of cryopreserved *Dendrobium* hybrid mature seeds. **Scientia Horticulturae**, v. 114, p. 188-193, 2007.

VENDRAME, W.A.; CARVALHO, V.S.; DIAS, J.M.M.; MAGUIRE, I. Pollination of *Dendrobium* hybrids using cryopreserved pollen. **HortScience**, v.43, p.264–267. 2008

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

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

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

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

ZAPPI, D.C.; FILARDI, F.L.R.; LEITMAN, P.; SOUZA, V.C.; WALTER, B.M.T.; PIRANI, J.R.; MORIN, M.P.; QUEIROZ, L.P.; CAVALCANTI, T.B.; MANSANO, V.F.; FORZZA, R.C. Growing knowledge: an overview of seed plant diversity in Brazil. **Rodrigésia**, v.66, n.4, 2015.

WATANABE, D.; MORIMOTO, M. S.; KIHARA, G. T. E.; MORIMOTO, L. M. **Orquídeas: manual de cultivo**. São Paulo, AOSP, 2002.

WITHERS, L.A.; WILLIAMS, J.T. Conservação *in vitro* de recursos de plantas. In: TORRES et al. (Ed). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: EMBRAPA, v.1, p.297-330, 1998.

ZANENGA-GODOY, R.; COSTA, C. G. Anatomia foliar de quatro espécies do gênero *Cattleya* Lindl. (Orchidaceae) do Planalto Central Brasileiro. **Acta Botânica Brasileira**, v.17, n.1, p.101-118, 2003.