



UNIVERSIDADE
ESTADUAL de LONDRINA

EDILENE APARECIDA PRETI FERRARI

**CRIOPRESERVAÇÃO DE SEMENTES DE ORQUÍDEAS
BRASILEIRAS**

Londrina
2016

EDILENE APARECIDA PRETI FERRARI

**CRIOPRESERVAÇÃO DE SEMENTES 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.

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Carmen Silvia Vieira Janeiro Neves.

Londrina
2016

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

Ferrari, Edilene Aparecida Preti .

Criopreservação de sementes de orquídeas brasileiras / Edilene Aparecida Preti Ferrari.
- Londrina, 2016.

71 f. : il.

Orientador: Ricardo Tadeu Faria.

Coorientador: Carmen Silvia Vieira Janeiro Neves.

Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2016.

Inclui bibliografia.

1. Criopreservação - Teses. 2. Sementes - Teses. 3. Congelamento - Teses. I. Faria, Ricardo Tadeu. II. Neves, Carmen Silvia Vieira Janeiro. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. IV. Título.

EDILENE APARECIDA PRETI FERRARI

CRIOPRESERVAÇÃO DE SEMENTES DE ORQUÍDEAS

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. Káthia Fernandes Lopes Pivetta
Universidade Estadual Paulista - UNESP

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

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

Prof. Dr. José Eduardo Lahoz da Silva Ribeiro
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Cássio Egidio Cavenaghi Prete
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 25 de fevereiro de 2016.

A Deus, por conceder a vida e a sabedoria necessária. Ao meu marido, minha mãe, irmãs e sobrinhos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, o qual me concedeu a sabedoria e a inteligência necessária para concluir mais esta etapa de minha vida.

A Universidade Estadual de Londrina por toda minha formação superior e pós-graduação.

Ao meu orientador, Ricardo Tadeu de Faria pelos valiosos ensinamentos e pela contribuição ao meu crescimento intelectual e científico.

À minha co-orientadora, Prof^a. Dr^a. Carmem Silvia Vieira Janeiro pela contribuição no desenvolvimento deste trabalho e por todo apoio e ensinamentos em minha vida acadêmica.

À CAPES pelo suporte financeiro.

À minha mãe, Verônica dos Santos Preti, por todo afeto, carinho, paciência e amor dedicado a mim, me apoiando e aconselhando.

Ao meu marido, Arolde Ferrari Junior, por todo o amor, carinho, atenção, cumplicidade e apoio em todos os momentos.

Às minhas irmãs, Angélica Carolina Preti e Jéssica de Lourdes Preti, por sempre estarem ao meu lado, me incentivando, escutando e ajudando.

Ao meu cunhado Wilson Nakanishi, pelo apoio e aconselhamento e por estar presente quando precisei.

Aos meus sobrinhos, Miguel Preti Nakanishi, Henrique Preti Nakanishi e Carolina Mayumi Preti Nakanishi por trazerem mais felicidade à minha vida.

À minha prima Tayla Lidia Dummer, pela contribuição ao trabalho.

Aos demais familiares que me apoiaram e incentivaram.

Aos companheiros de trabalho pela ajuda no desenvolvimento do projeto.

Aos funcionários do departamento de agronomia por contribuírem com minhas atividades e compromissos.

Aos meus amigos pelas orações e por estarem sempre ao meu lado e por me incentivarem a nunca desistir.

Que ninguém se engane: o caminho do sucesso só pode ser trilhado até o fim por quem trabalha com seriedade, humildade, simplicidade e respeito ao próximo.

(Autor desconhecido)

FERRARI, Edilene Aparecida Preti. **Criopreservação de Sementes de Orquídeas Brasileiras**. 2016. 68 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

RESUMO

A criopreservação é o método de conservação em que o material biológico é submetido à temperaturas extremamente baixas utilizando nitrogênio líquido (-196°C) ou em sua fase de vapor (-150°C), possibilitando a conservação de germoplasmas de interesse ou em risco de extinção, em um espaço relativamente pequeno. Para espécies de Orchidaceae, tem-se utilizado sementes, protocormos e suspensão de células. Na criopreservação é necessário a utilização de soluções que preservem a integridade da membrana e evite a formação dos cristais de gelo no interior das células. Essas soluções crioprotetoras são substâncias químicas que possuem ou não a habilidade de penetrar as membranas celulares. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da umidade e soluções crioprotetoras na criopreservação de sementes de orquídeas brasileiras do gênero *Cattleya* e *Miltonia*. No primeiro experimento, as sementes foram imersas em soluções crioprotetoras e de vitrificação e após em nitrogênio líquido (NL) (-196 °C), com os tratamentos: T1 - controle; T2 - glicerol 2M (20 min); T3 - sacarose 0,4M (20 min); T4 - glicerol 2M (20 min) + sacarose 0,4M (20 min); T5 - glicerol 2M (20 min) + PVS2 (10 min); T6 - glicerol 2M (20 min) + PVS2 + floroglucinol a 1% (10 min); T7 - sacarose 0,4M (20 min) + PVS2 (10 min); T8 - sacarose 0,4M (20 min) + PVS2 + floroglucinol a 1% (10 min); T9 - glicerol 2M (20 min) + sacarose 0,4M (20 min) + PVS2 (10 min); T10 - glicerol 2M (20 min) + sacarose 0,4M (20 min) + PVS2 + floroglucinol a 1% (10 min). No segundo experimento, as sementes das orquídeas *Cattleya labiata* Lindl. e *Miltonia regnelli* Rchb.f. foram submetidas ao processo de secagem em estufa ou aumento da umidade em recipiente de vidro hermético até alcançarem os graus de umidade estabelecidos para compor os seis tratamentos (4, 6, 8, 10, 12 e 15 %) e criopreservadas a -196°C durante 24 horas e, em seguida, descongeladas e analisadas. Em ambos os experimentos foram avaliadas a porcentagem de sementes viáveis, porcentagem de protocormos provenientes de sementes criopreservadas que se mantiveram vivos após 150 dias do subcultivo, massa fresca e seca de plântulas e número de brotos. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância. Este estudo demonstrou que é possível criopreservar sementes de *Cattleya labiata* Lindl. e *Miltonia regnelli* Rchb.f. diretamente em nitrogênio líquido (-196°C) sem a necessidade de pré-tratamento com soluções crioprotetoras sendo que o grau ideal de umidade para obtenção de maior percentual de sementes viáveis é de 4%.

Palavras-chave: Nitrogênio líquido. Sobrevivência. Viabilidade. Umidade. Crioprotetor.

FERRARI, Edilene Aparecida Preti. **Brazilian Orchids Seed Cryopreservation**. 2016. 68 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

ABSTRACT

Cryopreservation is the conservation method in which the biological material is submitted to extremely low temperatures using liquid nitrogen (-196°C) or its vapor phase (-150 °C), enabling the conservation of germplasm of interest or endangered, in a relatively small space. To species of Orchidaceae, we have used seed, and protocorm cell suspension. In cryopreservation it is necessary the use of solutions that preserve the integrity of the membrane and avoid the formation of ice crystals within the cells. These cryoprotectant solutions are chemical substances that have or not the ability to penetrate cell membranes. The purpose of this study was to evaluate the influence of moisture and cryoprotectant solutions in cryopreservation of Brazilian orchids seeds from *Cattleya* and *Miltonia* gender. In the first experiment, the treatments consisted of immersing the seeds in cryoprotectant solutions and vitrification before immersion in liquid nitrogen (NL) (-196 ° C), according to the following treatments: T1 - control; T2 - glycerol 2M (20 min); T3 - saccharose 0.4M (20 min); T4 - glycerol 2M (20 min) + saccharose 0.4 M (20 min); T5 - glycerol 2M (20 min) + PVS2 (10 min); T6 - glycerol 2M (20 min) + PVS2 with phloroglucinol at 1% (10 min); T7 - saccharose 0.4 M (20 min) + PVS2 (10 min); T8 - saccharose 0.4M (20 min) + PVS2 with phloroglucinol at 1% (10 min); T9 - glycerol 2M (20 min) + saccharose 0.4 M (20 min) + PVS2 (10 min); T10 - glycerol 2M (20 min) + saccharose 0.4 M (20 min) + PVS2 with 1% phloroglucinol (10 min). In the second experiment, the *Cattleya labiata* Lindl. and *Miltonia regnelli* Rchb.f. orchids seeds were submitted to the drying process in oven or increased humidity in airtight glass container, until they reach the moisture established to compose the six treatments (4, 6, 8, 10, 12 and 15%) and cryopreserved at -196 ° C for 24 hours and then thawed and analyzed. In both experiments, the viable seeds percentages were evaluated, percentage of protocorms derived from cryopreserved seeds that remained alive after 150 days of subculture, fresh and dry mass seedlings and number of sprouts. The data were submitted to analysis of variance (ANOVA) and average compared by the test of Tukey at 5%. This study demonstrates that it is possible cryopreservation of *Cattleya labiata* Lindl. and *Miltonia regnelli* Rchb.f. seeds directly in liquid nitrogen (-196 ° C) without the need of pretreatment with cryoprotectant solutions being that the optimum moisture content for obtaining a greater percentage of viable seeds is 4%.

Key-words: Liquid nitrogen. Survival. Viability. Moisture. Cryoprotectant.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1.1 –	(A) Inflorescência de <i>Cattleya loddigesii</i> Lindl. (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	15
Figura 2.2.1 –	Sementes da orquídea <i>Oncidium baueri</i> Lindl. extraídas de um único fruto	17
Figura 2.4.1 –	Sementes de orquídea <i>Oncidium baueri</i> Lindl. submetidas ao teste de viabilidade pelo método do tetrazólio. Semente vazia (a), semente inviável (b), semente viável (c)	21
Figura 2.4.2 –	Protocolo para criopreservação pelo método do congelamento lento	24
Figura 2.4.3 –	Protocolo para criopreservação pelo método do congelamento rápido	25
Figura 2.4.4 –	Protocolo para criopreservação pelo método da vitrificação.....	27
Figura 3.1.1 –	Sementes criopreservadas em nitrogênio líquido e submetidas ao teste de tetrazólio: <i>Cattleya labiata</i> Lindl.(a) e <i>Miltonia regnelli</i> Rchb.f.(b); plântula oriunda de sementes submetidas a criopreservação em nitrogênio líquido pré-tratadas 150 dias após o subcultivo: <i>Cattleya labiata</i> Lindl.(c) e <i>Miltonia regnelli</i> Rchb.f.(d).....	48
Figura 3.2.1 –	Recipiente de vidro hermético utilizado no aumento do grau de umidade das sementes.....	59
Figura 3.2.2 –	Sementes criopreservadas em nitrogênio líquido com 4% de umidade e submetidas ao teste de tetrazólio: <i>Cattleya labiata</i> Lindl. (a) e <i>Miltonia regnelli</i> Rchb.f. (b); plântula oriunda de sementes submetidas a criopreservação em nitrogênio líquido com 4% de umidade 150 dias após o subcultivo: <i>Cattleya labiata</i> Lindl. (c) e <i>Miltonia regnelli</i> Rchb.f. (d).	62

LISTA DE TABELAS

- Tabela 3.1.1** – Porcentagem de sementes viáveis (SV) de *Cattleya labiata* Lindl. e *Miltonia regnelli* Rchb.f., pelo método do tetrazólio, tratadas com soluções crioprotetoras e submetidas à criopreservação em nitrogênio líquido e porcentagem de protocormos provenientes de sementes criopreservadas que se mantiveram vivos após 150 dias do subcultivo (PV).49
- Tabela 3.1.2** – Massa fresca (g) (MFP) e massa seca (g) (MSP) de plântulas de *Cattleya labiata* Lindl. e *Miltonia regnelli* Rchb.f. e número de brotos (NB) de *Cattleya labiata* Lindl., tratadas com soluções crioprotetoras e submetidas à criopreservação em nitrogênio líquido.50
- Tabela 3.2.1** – Porcentagem de sementes viáveis (SV) de *Cattleya labiata* Lindl. e *Miltonia regnelli* Rchb.f., pelo método do tetrazólio, submetidas a criopreservação em nitrogênio líquido com diferentes graus de umidade e porcentagem de protocormos provenientes de sementes criopreservadas que se mantiveram vivos após 150 dias do subcultivo (PV).63
- Tabela 3.2.2** – Massa fresca (g) (MFP) e massa seca (g) (MSP) de plântulas de *Cattleya labiata* Lindl. e *Miltonia regnelli* Rchb.f. e número de brotos (NB) de *Cattleya labiata* Lindl., oriundas de sementes criopreservadas em nitrogênio líquido com diferentes graus de umidade.64

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1	FAMÍLIA ORCHIDACEAE.....	14
2.2	SEMENTES DE ORQUÍDEA	16
2.3	SEMENTES ORTODOXAS E RECALCITRANTES.....	18
2.3.1	VIABILIDADE DAS SEMENTES	19
2.4	CRIOPRESERVAÇÃO	22
2.4.1	Fundamento e Definições	22
2.4.2	Princípios e Metodologias	23
2.4.2.1	Congelamento lento e rápido	23
2.4.2.2	Vitrificação	25
2.4.2.3	Desidratação	27
2.4.2.4	Encapsulamento.....	27
2.4.2.5	Encapsulamento-desidratação	28
2.4.2.6	Droplet freezing	28
2.4.3	Crioprotetores.....	29
2.4.4	Criopreservação de Orquídeas	30
2.4.4.1	Criopreservação de sementes de orquídeas.....	30
	REFERÊNCIAS	33
3	ARTIGOS	42
3.1	ARTIGO A: SOLUÇÕES CRIOPROTETORAS NA CRIOPRESERVAÇÃO DE SEMENTES DE ORQUÍDEAS BRASILEIRAS	42
3.1.1	Resumo	42
3.1.2	Introdução.....	43
3.1.3	Material e Métodos.....	44
3.1.4	Resultados e Discussão.....	47
3.1.5	Conclusão	52
3.1.6	Referências	53

3.2	ARTIGO B: GRAU DE UMIDADE NA CRIOPRESERVAÇÃO DE SEMENTES DE ORQUÍDEAS NATIVAS DO BRASIL.....	56
3.2.1	Resumo	56
3.2.2	Introdução	57
3.2.3	Material e Métodos	58
3.2.4	Resultados e Discussão.....	61
3.2.5	Conclusão	65
3.2.6	Referências	66
4	CONCLUSÕES GERAIS	68

1 INTRODUÇÃO

No mundo existem cerca de 30.000 espécies de orquídeas. A maioria dessas espécies são de regiões tropicais com clima quente e úmido. O Brasil é um dos países mais ricos em orquídeas possuindo cerca de 10% do total mundial das espécies, sendo comparável apenas à Colômbia e Equador (DRESSLER, 2005).

O Ministério do Meio Ambiente, com base em documentação científica, classificou 34 espécies em risco de extinção, devido ao extrativismo predatório e a destruição de seus habitats.

Os bancos de sementes são ferramentas importantes para algumas espécies sendo a forma mais simples de conservação e manutenção da existência de materiais genéticos, além de serem mais seguros em relação às plantas que estão sujeitas a ataque de doenças, pragas e outros intempéries.

A criopreservação é o método de conservação *ex situ*, em que o material biológico é submetido à temperaturas extremamente baixas utilizando nitrogênio líquido (-196°C) ou em sua fase de vapor (-150°C), com a manutenção das características originais do material após o descongelamento. Esse método permite conservar materiais biológicos incluindo, pólen, sementes, protocormos e meristemas por tempo indeterminado possibilitando assim, a conservação de germoplasmas de espécies de interesse ou em risco de extinção em um espaço relativamente pequeno.

O sucesso na criopreservação depende dos níveis de tolerância de diferentes espécies, e mesmo entre tecidos de uma mesma espécie, à desidratação e ao congelamento. Geralmente estruturas menores com pouca quantidade de água são mais apropriadas, pois desidratam e congelam mais rápido e uniformemente, além de reduzir o risco de formação de cristais de gelo e rompimento das membranas. A desidratação, congelamento, descongelamento e regeneração são etapas críticas para o sucesso da criopreservação.

Para a criopreservação de Orchidaceae, são utilizados sementes, protocormos e suspensão de células. As sementes de orquídeas são extremamente pequenas e leves, pesando entre 0,3 a 14 µg, sendo que suas dimensões estão entre 0,05 e 6,0 mm de comprimento por 0,09 a 0,27mm de largura (ARDITTI, 1992). A longevidade destas sementes é baixa se armazenada a temperatura ambiente,

especialmente em regiões quentes e úmidas. Por isso, o método tradicional consiste em conservá-las em freezer a -18°C e 5% de umidade, mas estudos mostraram que a preservação é por cerca de dez.

As sementes de orquídeas possuem pouco tecido de reserva, porém conforme seu grau de umidade, pode apresentar problemas na criopreservação. Para minimizar os efeitos da criopreservação tem-se utilizado soluções que preservem a integridade da membrana e evitam a formação dos cristais de gelo. Essas soluções chamadas de crioprotetoras são definidas como substâncias químicas que reduzem a injúria sofrida pela célula durante seu congelamento e descongelamento. Existem dois tipos de crioprotetores, os que possuem a habilidade de penetrar as membranas celulares e os que não possuem essa habilidade. Resultados tem sido obtidos utilizando glicerol e sacarose como crioprotetores e PVS2 como solução de vitrificação na criopreservação de materiais vegetais.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da umidade e soluções crioprotetoras na criopreservação de sementes de orquídeas brasileiras do gênero *Cattleya* e *Miltonia*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

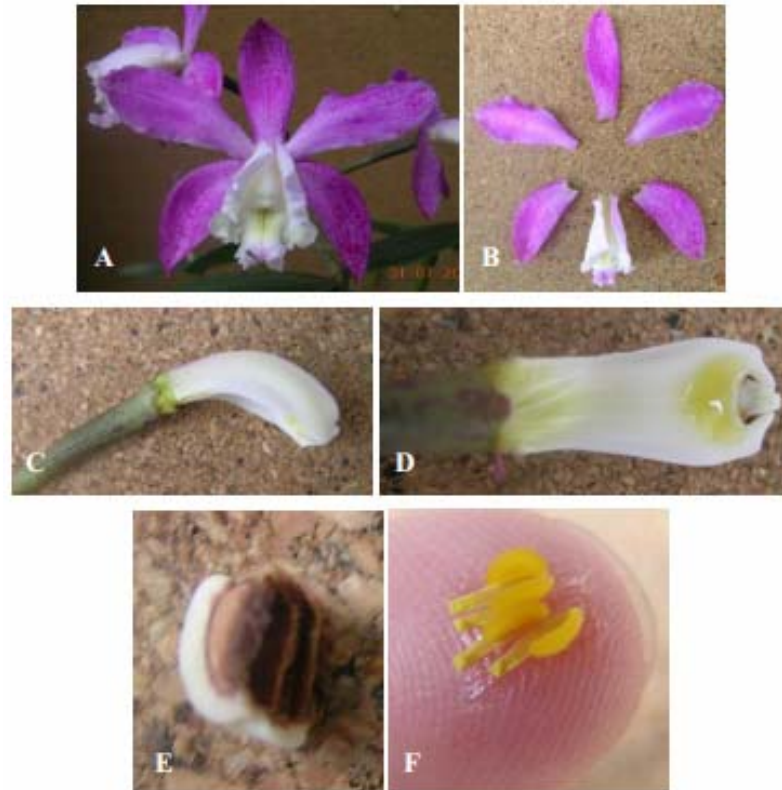
2.1 FAMÍLIA ORCHIDACEAE

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 do planeta, com exceção dos Polos e regiões desérticas. São plantas herbáceas, perenes, terrícolas ou epífitas (DRESSLER, 2005; SOUZA; LORENZI, 2008).

Apresenta ampla diversidade na região equatorial, em países como Colômbia, Equador, Brasil e Peru. Aproximadamente 10% do total de espécies de orquídeas do mundo são encontradas no Brasil, destas, mais de 64,2% são endêmicas deste país. São encontradas em praticamente todo o território nacional, mas são predominantes em formações florestais úmidas, principalmente na Mata Atlântica (ZAPPI et al., 2015).

A família Orchidaceae caracteriza-se por possuir flores hermafroditas, raramente unissexuais, freqüentemente zigomorfas, raramente assimétricas, trímeras, com três sépalas e três pétalas, sendo uma delas, a oposta ao estame fértil, morfológicamente modificada constituindo o labelo. O androceu é constituído de um, raro 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 mais ou menos membranácea que separa a antera do estigma; a antera, na maioria dos casos é representada por um “capuz” que geralmente cai no processo de retirada do pólen; o pólen na maioria das espécies é unido em polínias, em número de 2, 4, 6 ou 8; o ovário é ínfero, em regra unilocular, com placentação parietal (Figura 2.1.1). Os frutos são capsulares e quase secos, raramente carnosos; as sementes são numerosas, minúsculas, com embrião rudimentar, desprovidas de endosperma (RODRIGUES, 2011).

Figura 2.1.1 – (A) Inflorescência de *Cattleya loddigesii* Lindl. (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 e aparência nobre, porém tem crescido o número de estudos relacionados à sua função para a indústria alimentícia e farmacológica. A baunilha (vanilina), por exemplo, extraída do fruto de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews, como essência aromatizante, é a forma mais conhecida de utilização de orquídeas na indústria alimentícia, entretanto, existem outras 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). Segundo Koyashiki (2014), existem estudos em andamento que comprovam a eficiência da ação de substâncias de orquídeas nativas do Paraná contra o sarcoma de ovário. Em métodos homeopáticos, tem-se usado *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).

A espécie *Cattleya labiata* Lindl. Lindl. é nativa do nordeste do Brasil, nos estados do Ceará, Pernambuco e Alagoas, seu o florescimento ocorre no mês de outubro. A *Miltonia regnelli* Rchb.f. é nativa da região Sul e Sudeste do Brasil, em áreas de Mata Atlântica e tem seu florescimento no período de janeiro a maio (BARROS et al., 2010).

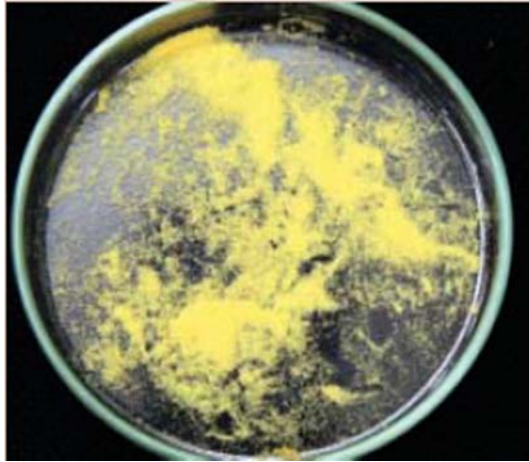
O Ministério do Meio Ambiente, com base em documentação científica, indica 34 espécies de orquídeas em risco de extinção, ou seja, aquelas com alto risco de desaparecimento na natureza em futuro próximo devido ao extrativismo predatório e a destruição de seus habitats (BRASIL, 2008).

Em 2013 foi lançado o “Livro Vermelho da Flora do Brasil” que traz 169 espécies de orquídeas em risco de extinção. 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. Segundo os autores, suspeita-se que a *Cattleya labiata* Lindl. tenha sofrido uma redução populacional de 30% nos últimos dez anos e caso as ameaças incidentes não cessem, a população pode vir a sofrer uma redução de mesmo valor nos próximos dez anos. A espécie, por isso, foi avaliada como “Vulnerável” (MARTINELLI; MORAES, 2013). Por sua vez, a *Miltonia regnelli* Rchb.f. não aparece na lista das espécies em risco de extinção.

2.2 SEMENTES DE ORQUÍDEA

As orquídeas são capazes de produzir milhares de sementes e estão entre as de menor tamanho das fanerógamas (Figura 2.2.1), porém, sua comercialização não ocorre devido a particularidades das condições de germinação (FARIA et al., 2012).

Figura 2.2.1 – Sementes da orquídea *Oncidium baueri* Lindl. extraídas de um único fruto.



Fonte: Próprio autor

Segundo Dressler (1990), na natureza, uma porcentagem muito pequena das sementes de orquídea consegue germinar e formar novas plantas e as que conseguem, fazem isso através de associação simbiótica com fungos micorrízicos.

Devido à contínua destruição dos habitats naturais, comércio ilegal e ação de colecionadores de orquídeas, muitas espécies estão desaparecendo (HOSSAIN, 2008). A extinção eminente de várias espécies não depende somente da crescente exploração, mas também se deve a uma lenta multiplicação por vias naturais de propagação (JUNGHANS; SOUZA, 2009). Por isso, a germinação de sementes de orquídeas *in vitro*, em meio de cultura asséptico, vem sendo realizada desde o início do século passado (KNUDSON, 1924).

A produção de orquídeas *in vitro* é uma técnica bastante relevante do ponto de vista comercial e ecológico, pois, as plantas produzidas dessa forma 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).

Segundo Faria et al. (2002), para que se tenha sucesso com a cultura *in vitro*, é necessário que se conheça requerimentos nutricionais das células e dos tecidos em cultura, pois a formulação do meio de cultura é essencial para o explante possibilitando a presença dos constituintes necessários para seu desenvolvimento (minerais, vitaminas, reguladores de crescimento, etc.), podendo

ser formulados com diferentes combinações de acordo com os requerimentos de cada espécie.

Para a conservação de orquídeas, são necessárias estratégias e os bancos de semente, tem se mostrado uma opção para preservação *ex situ* (ALLEM, 2001). Mas para o sucesso na preservação *ex situ* de germoplasmas de orquídeas, é necessário conhecer seu comportamento quando submetidas à redução do grau de umidade e ao armazenamento em temperaturas baixas (PRITCHARD; SEATON, 1993; KOOPOWITZ, 2001).

Testes de viabilidade das sementes armazenadas, como germinação *in vitro*, são indispensáveis para avaliar a qualidade do banco de sementes. As vantagens destes bancos de sementes se concentram no fato de manter sementes de inúmeras espécies em um pequeno espaço físico, com capacidade para serem germinadas e originarem novas plantas. Além disso, a diversidade biológica do material é mantida com a utilização de sementes como fonte de explantes (MACHADO NETO; CUSTODIO, 2005).

2.3 SEMENTES ORTODOXAS E RECALCITRANTES

O armazenamento de sementes constitui uma forma segura e econômica de conservação da diversidade genética vegetal e no caso de espécies florestais, representa uma estratégia para suprir a demanda contínua de mudas para fins comerciais, reflorestamentos e recomposição de áreas degradadas. Para o armazenamento eficiente das sementes, sua qualidade deve ser mantida pelo maior período possível, o que depende do conhecimento prévio de seu comportamento durante o armazenamento (COSTA, 2014).

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

Sementes sensíveis à dessecação, que não sobrevivem em baixos níveis de umidade, o que impede o seu armazenamento por longo prazo, são classificadas como recalcitrantes (ROBERTS, 1973). Além destes grupos há um

terceiro, no qual as sementes apresentam um comportamento de armazenamento intermediário ao ortodoxo e ao recalcitrante. Toleram a desidratação de 7,0% a 10% de umidade e não toleram baixas temperaturas durante período de tempo prolongado. Assim, a classificação das sementes quanto à capacidade de armazenamento depende de estudos de tolerância à dessecação e do armazenamento sob temperaturas baixas (HONG e ELLIS, 1996).

As sementes de orquídeas apresentam comportamento semelhante aos das sementes ortodoxas e, como tais, são fisiologicamente afetadas pelas condições de armazenamento, incluindo as de criopreservação (PRITCHARD; SEATON, 1993; PRITCHARD; POYNTER; SEATON, 1999; PRITCHARD; PRENDERGAST, 1989).

Pritchard e Seaton (1993) estudando as características de armazenamento de sementes de orquídeas, que são classificadas como "ortodoxas", observaram que a longevidade das sementes é aumentada pela redução do grau de umidade (de cerca de 20%, base úmida, a 5%) e as temperaturas de armazenamento decrescentes (a partir de 62°C a 0°C). Quando armazenado seco a 5-8°C, o tempo necessário para a viabilidade cair para 50% pode ser 8-14 anos, levando em conta a alta qualidade inicial. No entanto, as sementes de *Cattleya aurantiaca* (Bateman ex Lindl.) P.N.Don apresentaram redução na longevidade a 5°C quando armazenadas com grau de umidade acima e abaixo de 5%, o que indica que o estado da água ideal para estas sementes durante o armazenamento é de aproximadamente 30% de umidade relativa do ar. Sementes de *Cattleya aurantiaca* (Bateman ex Lindl.) P.N.Don em 2,2-5,6% de umidade geralmente apresentaram redução da longevidade a -18°C em comparação com 5°C.

2.3.1 VIABILIDADE DAS SEMENTES

No trabalho 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. Dentre os testes rápidos, o teste de tetrazólio é usado, pois permite determinar a viabilidade de sementes, particularmente, daquelas que apresentam dormência, as recalcitrantes e as que germinam lentamente (BRASIL, 2009).

As Regras de Análise de Sementes (BRASIL, 2009) definem que o

tetrazólio é um teste bioquímico, que reflete 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 pregerminativos, danos por secagem, por insetos e por umidade, bem como, para detectar danos mecânicos de colheita e/ou beneficiamento.

De acordo com França Neto (1994), a hidrogenação do 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio produz nas células vivas do embrião uma substância vermelha, estável e não difusível, o trifênil formazan, que permite distinguir as partes vivas coloridas de vermelho daquelas mortas que mantêm a sua cor original.

Para obtenção de resultados confiáveis sobre a qualidade das sementes, alguns parâmetros são fundamentais, tais como: pré-condicionamento das sementes, podendo ser em solução de sacarose, água, corte ou escarificação das sementes; concentração da solução de tetrazólio; tempo de exposição à solução; temperatura de condicionamento e avaliação adequada da coloração das sementes (OLIVEIRA; CARVALHO; DAVIDE, 2005; PINHO et al., 2011; BARROS et al., 2005).

As orquídeas apresentam sementes com tamanho e massa muito pequenos, processo germinativo muito lento e espaçado, o que dificulta a execução de testes para determinação do vigor e da viabilidade por germinação. Porém, a metodologia para realização do teste de tetrazólio em sementes de orquídeas ainda não foi completamente estabelecida.

Em trabalho com orquídeas do gênero *Cattleya*, Hosomi (2012) concluiu que o pré-condicionamento em sacarose 10% melhorou a coloração das sementes facilitando a identificação das sementes viáveis e também, que soluções com concentração acima de 0,25% possibilitam a avaliação da viabilidade se o período de exposição ao sal for acima de 6 horas.

Franceschi (2013) obteve sucesso na avaliação da viabilidade de sementes de *Brasilidium praetextum* (Rchb.f.) Campacci, *Gomesa recurva* R.Br., *Grandiphyllum pulvinatum* (Lindl.) Docha e *Brasilidium forbesii* (Hook.) Campacci pelo teste do tetrazólio pré-condicionando as sementes em solução de sacarose a 10% por 24 horas e em seguida transferindo para solução neutra de tetrazólio 0,1%

por 24 horas a 40°C.

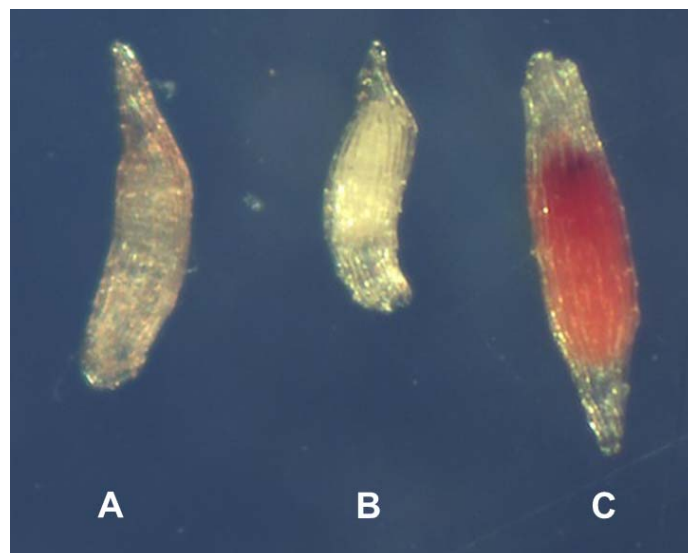
O teste de tetrazólio foi utilizado para avaliação da viabilidade das sementes de orquídeas do gênero *Cymbidium*, em solução a 1% durante 24 horas a 25°C em ambiente escuro (HIRANO et al., 2011).

Não foi observado diferença na porcentagem média de embriões corados de *Cyrtopodium saintlegerianum* Rchb.f. submetidos à solução de tetrazólio 1% por 12 ou 24 horas a 30°C, em banho de água (SILVA, 2012).

A diversidade de metodologias utilizadas para a avaliação da viabilidade das sementes de orquídeas demonstra se há necessidade do pré-condicionamento, a temperatura de condicionamento, a concentração da solução, e a duração do período.

Segundo Hosomi (2012) um método eficiente para análise das sementes submetidas aos testes de tetrazólio é o de digitalização de imagens, pois permite diferenciar e quantificar com clareza as sementes viáveis, coradas de vermelho, das sementes inviáveis, com coloração branca, sendo possível a identificação de sementes sem embrião (Figura 2.4.1). Esse método pode levar à diminuição dos custos e a maior agilidade dos testes.

Figura 2.4.1 – Viabilidade de sementes de orquídea *Oncidium baueri* Lindl. pelo teste do tetrazólio. Semente vazia (a), semente inviável (b), semente viável (c).



Fonte: Próprio autor

2.4 CRIOPRESERVAÇÃO

2.4.1 Fundamento e Definições

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

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

Em temperaturas tão baixas, o material é levado a um estado em que não ocorre divisão celular e o metabolismo sofre praticamente uma paralisação, o que permite a conservação desse material por um período longo, em um espaço relativamente pequeno. As vantagens desse método em relação à conservação *in vitro* além do tempo de conservação, que é maior, os riscos de perda do material são menores assim como o custo para manutenção (VIEIRA, 2000).

Os estudos com criopreservação de materiais vegetais foi intensificado e diversos resultados mostram, em sua maioria, o sucesso com esta forma de conservação das mais variadas espécies, tais como *Jatropha curcas* L. (GOLDFARB et al., 2010), *Caesalpinia echinata* Lam. (MOTTA et al., 2007), *Tabebuia impetiginosa* (Mart. ex DC.) Standl. (MARTINS et al., 2009), *Allium cepa* L. (MOLINA et al., 2006), *Ricinus communis* L. (SANTOS, 2010).

De acordo com Vendrame et al. (2014), o ponto crítico da criopreservação é o grau de umidade das sementes que passaram por esse processo, pois se houver pouca água nos tecidos, estes sofrerão desidratação excessiva e não sobreviverão. Por outro lado, se houver grande quantidade de água, haverá a formação de cristais de gelo no interior das células. Essas estruturas podem ocasionar o rompimento da membrana celular e resultar em morte das células, e evitar a formação desses cristais de gelo contribuirá grandemente para o

sucesso da criopreservação (BIAN et al., 2002).

Os protocolos devem abranger os procedimentos de coleta e desinfecção das sementes, técnicas de desidratação e graus de umidade 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.

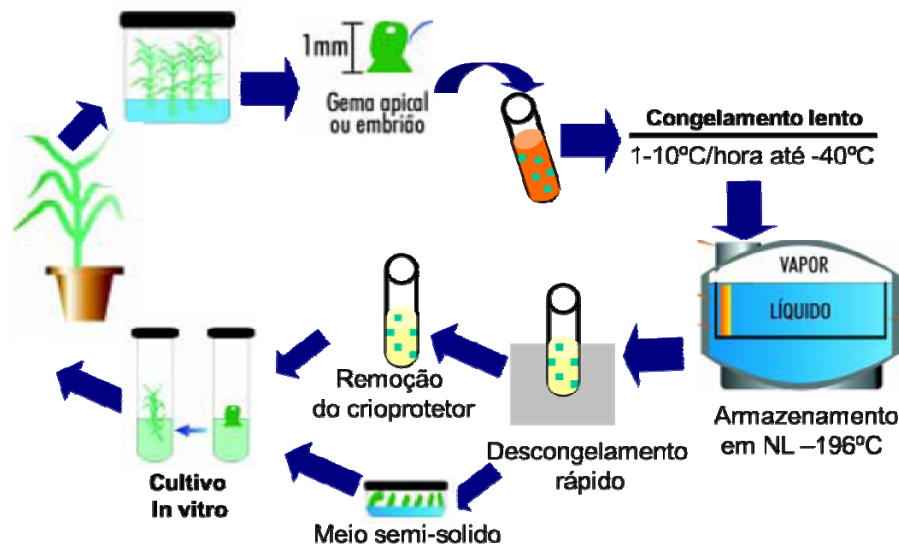
2.4.2 Princípios e Metodologias

Na criopreservação, a tolerância dos tecidos vegetais à desidratação e à temperatura do nitrogênio líquido (-196°C) influencia na sua sobrevivência. Assim, é de grande importância conhecer quais os mecanismos bioquímicos e biofísicos que são responsáveis pela resposta dos tecidos à desidratação e ao congelamento (STUSHNOFF; SEUFFERHELD, 1995). Em temperaturas ultrabaixas, os únicos estados físicos que existem são o cristalino e o vítreo, em ambos o metabolismo é praticamente nulo (KARTHA, 1985).

2.4.2.1 Congelamento lento e rápido

Segundo Engelmann (1997), entre os primeiros métodos de criopreservação desenvolvidos está o congelamento lento, no qual é feito o resfriamento e o congelamento do material vegetal de forma lenta até uma temperatura por volta de -40°C a uma velocidade de 1 a $10^{\circ}\text{C}/\text{hora}$, usando um congelador programável, seguido de imersão direta em nitrogênio líquido (Figura 2.4.2).

Figura 2.4.2 – Protocolo para criopreservação pelo método do congelamento lento

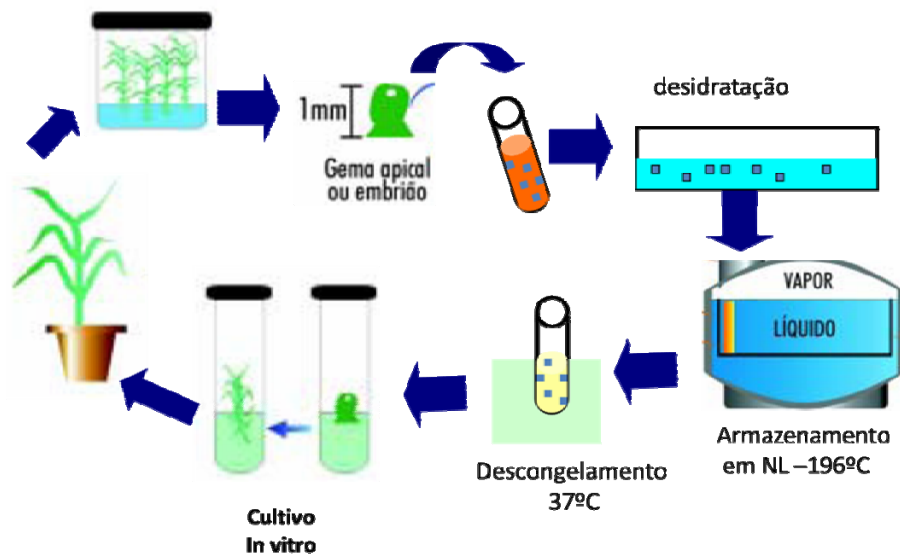


Fonte: Autor desconhecido

Por esse método ocorre a formação de gelo no meio externo, enquanto o meio intracelular fica em estado de super-resfriamento, mas não congelam. Se este processo ocorrer de forma bastante lenta, a célula perde água pois a pressão de vapor da água na célula excede aquela do exterior celular 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 das células ou entre o protoplasto e a parede celular, ocorrendo assim, o processo chamado de desidratação induzida por congelamento, evitando portanto, a formação de gelo em seu interior. Quando o potencial hídrico das células parcialmente desidratadas iguala-se ao do gelo extracelular, um equilíbrio é estabelecido e a desidratação adicional não ocorrerá, contanto que a temperatura permaneça constante (SANTOS, 2000).

No congelamento pelo método rápido (Figura 2.4.3) a desidratação causada pelo estado de super-resfriamento do meio intracelular não ocorre e os cristais de gelo são formados no interior das células, causando injúrias e até a morte destas, mas após o descongelamento as células intactas podem reabsorver água e ganhar turgor novamente (STEPONKUS e WEBB, 1992).

Figura 2.4.3 – Protocolo para criopreservação pelo método do congelamento rápido.



Fonte: Autor desconhecido

2.4.2.2 Vitrificação

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

É um método eficiente contra o congelamento, pois as soluções crioprotetoras utilizadas são altamente concentradas e superesfriam sob temperatura muito baixa, assim, ocasionam a solidificação das estruturas de forma que se mantenham viscosas e estáveis, além de evitar a formação de cristais de gelo no interior das células e injúrias causadas por estes (SAKAI, 1995).

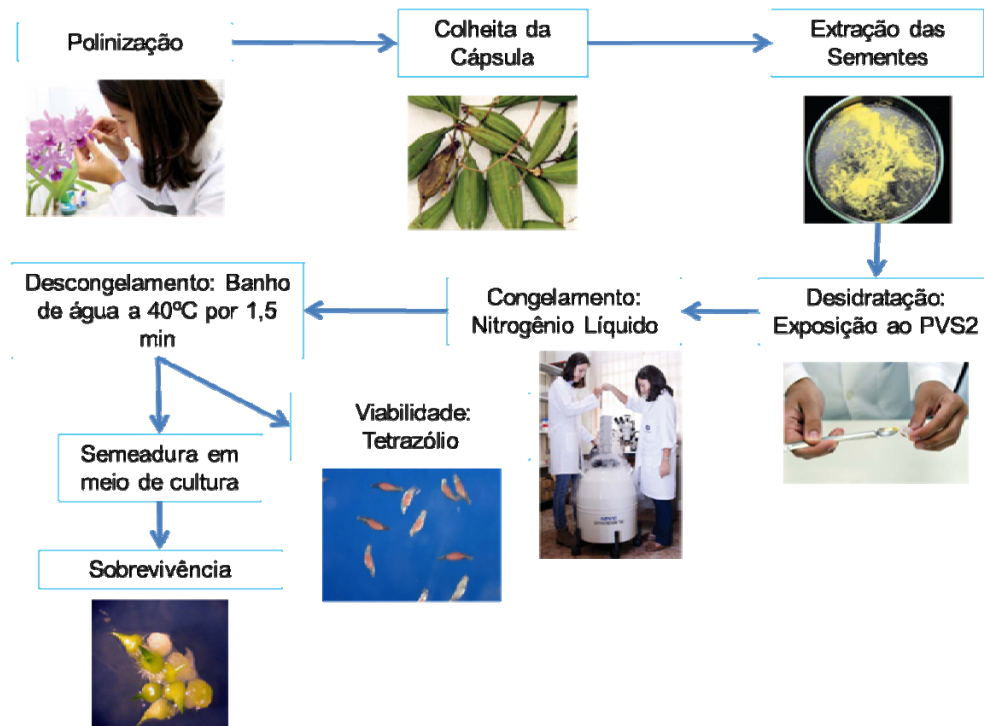
O estado vítreo tem muitos outros efeitos benéficos para a célula desidratada: limitação da perda de água, da cristalização de sais e proteínas no citoplasma, proteção contra mudanças no pH à medida que a água é removida, e prevenção de colapso celular durante a perda de água. A vitrificação restringe a difusão de substratos e produtos dentro da célula, levando a um estado de quiescência metabólica e resultando na prevenção de reações químicas dependentes do processo de difusão. Devido a estas características do estado vítreo, a deterioração de sistemas biológicos é suprimida, assegurando a estabilidade durante o período de quiescência (SANTOS, 2000).

A vitrificação é obtida através da desidratação dos tecidos até um grau de umidade em que não existe água livre para a cristalização antes de mergulharem no nitrogênio líquido. Isso pode ser feito por dessecação em fluxo laminar ou dessecador com sílica gel e também, por tratamento com soluções químicas altamente concentradas de crioprotetores, tais como dimetilsulfóxido (DMSO), etileno glicol, metanol, glicerol e propileno glicol. Açúcares como a sacarose, trealose e glucose têm sido utilizados com essa finalidade por serem excelentes agentes vitrificadores e por não apresentarem toxicidade para as células vegetais, mesmo quando se acumulam em grande quantidade nas células (KARTHA, 1985; SAKAI, 1995).

O PVS2 (plant vitrification solution 2) é uma das soluções mais utilizada no processo de vitrificação. Originalmente composta de 30% de glicerol, 15% de etileno glicol, 15% DMSO e 0,15 mol L⁻¹ de sacarose (SAKAI; KOBAYASHI; OIYAMA, 1990), posteriormente foi modificado e passou-se a utilizar a concentração de 0,4 mol L⁻¹ de sacarose (NISHIZAWA et al., 1993).

Após o tratamento com soluções crioprotetoras e de vitrificação, o material vegetal é imerso em nitrogênio líquido e congelado. Segundo Bajaj (1995), o descongelamento pode ser de modo lento à temperatura ambiente ou rápido pela imersão dos recipientes em água à 37 a 40°C (Figura 2.4.4).

Figura 2.4.4 – Protocolo para criopreservação pelo método da vitrificação.



Fonte: Próprio autor

Panis e Lambardi (2006) destacam que o método da vitrificação se mostrou por diversas vezes ser muito eficiente para a conservação de explantes de ápices caulinares de plantas lenhosas.

2.4.2.3 Desidratação

Segundo Engelmann (2004), o método consiste em desidratar o material vegetal em câmara de fluxo laminar ou em dessecador com sílica gel e posteriormente imersão em nitrogênio líquido para congelamento rápido. É uma técnica que tem sido aplicada em embriões zigóticos, ápices caulinares e eixos embrionários.

2.4.2.4 Encapsulamento

De acordo com Vendrame et al. (2014), é um método baseado na tecnologia de produção de sementes sintéticas, em que o material vegetal é envolto por uma cápsula de alginato de cálcio. Após esse procedimento o material é

submetido ao pré-cultivo em meio com alta concentração de sacarose, a desidratação e então ao congelamento em nitrogênio líquido.

2.4.2.5 Encapsulamento-desidratação

O encapsulamento-desidratação é um método proposto por Dereuddre et al. (1990), em que célula, tecido ou órgão de uma planta são encapsulados em gel de alginato de cálcio, as quais são então pré-cultivadas em um meio contendo altos níveis de sacarose, desidratados por exposição ao ar da capela de fluxo laminar ou com sílica gel, diretamente imersos em nitrogênio líquido e lentamente descongelados, protegendo a estrutura embebida e tornando-a resistente a tratamentos que poderiam ser letais (PAULET et al., 1993).

Bachiri et al. (1995) comentam que esse método facilita o manuseio de explantes muito pequenos, simplifica o meio crioprotetor, não utiliza congeladores programáveis, independe da velocidade de congelamento e possibilita um maior número de explantes sobreviventes à exposição ao nitrogênio líquido.

Trabalhos têm demonstrado o sucesso com o uso desse método para diferentes órgão e tecidos de várias espécies, tais como, *Rabdosia rubescens* (Hemsl.) H.Hara (AI; LU; SONG, 2012); *Artemisia herba-alba* Asso. (SHARAF et al., 2012); videira (GANINO et al., 2012) além da Orchidaceae *Cyrtopodium hatschbachii* Pabst (SURENCISKI et al., 2012).

2.4.2.6 Droplet freezing

Consiste no tratamento do material vegetal com soluções crioproteras, depois com solução de vitrificação e em seguida o material é colocado sobre tiras de papel alumínio com gotículas de solução de vitrificação, e assim, são submetidas ao congelamento em nitrogênio líquido (SANT et al., 2008).

O uso desse método é mais frequente na criopreservação de meristemas, e diversos autores relataram o sucesso no uso desta técnica em merismas de bananeira (PANIS; PIETTE; SWENNEN, 2005), macieira (CONDELLO et al., 2009), oliveira (SÁNCHEZ-ROMERO; SWENNEN; PANIS, 2009) e abacateiro (GUZMAN et al., 2009).

2.4.3 Crioprotetores

Segundo Vendrame et al. (2014), um dos problemas enfrentados durante o processo de criopreservação era os danos sofridos pelas células, mais especificamente pelas membranas celulares, devido à desidratação e aumento da concentração de soluto além da formação de cristais de gelo que causam o rompimento destas membranas e conseqüentemente a morte da célula. Assim, a descoberta de substâncias chamadas crioprotetoras, capazes de proteger as células de possíveis injúrias, fez com que a técnica de criopreservação obtivesse um grande avanço e sucesso com os resultados.

A primeira ação crioprotetora descoberta foi a do glicerol. Isso ocorreu acidentalmente em 1949 durante a tentativa de preservar espermatozóides de aves. Dez anos mais tarde foi descrito a utilização do dimetilsulfóxido (DMSO) como agente crioprotetor, com a característica de conferir maior permeabilidade a vários tipos de células em relação ao glicerol (CASTRO et al., 2011). O DMSO tornou-se a substância crioprotetora mais utilizada, embora haja indícios de ter efeitos tóxicos quando utilizada à temperatura ambiente (SIMIONE, 1998).

As substâncias crioprotetoras são classificadas entre intracelulares e extracelulares. As intracelulares são solventes orgânicos de baixo peso molecular que possuem a capacidade de penetrar na célula (RALL; REID; POLGE, 1984), como por exemplo, propilenoglicol, etilenoglicol, glicerol e DMSO. As extracelulares são substâncias que não penetram na célula e são responsáveis pela desidratação causada por uma maior concentração de solutos no meio externo da célula (FRANKS, 1982), como por exemplo, sacarose, amido, polivinilpirrolidona (PVP) e óxido de polietileno.

O floroglucinol (1,3,5-tri-hidroxibenzeno) é um benzenotriol conhecido pela sua propriedade de regulador de crescimento (SARKAR; NAIK, 2000). Estudos mostram que o floroglucinol tem sido usado para aumentar o crescimento e a taxa de rebentos axilares em várias plantas lenhosas, estimular o desenvolvimento de raízes adventícias em brotos *in vitro* de espécies arbóreas diferentes, aumentar a sobrevivência dos meristemas ou ápices caulinares *in vitro* (JONES, 1976; JAMES, 1997, 1983; GOUDARZI et al., 1997; DEMIRALAY et al., 1998), além de apresentar um efeito sinérgico com auxina durante a formação de raiz (JAMES; THURBON, 1981; SHARIFIAN et al, 2009). Floroglucinol é também conhecido por proteger as células

contra danos oxidativos por radicais livres e por possuir efeito crioprotetor contra o stress oxidativo e metabólicos relacionados (BENSON; BREMNER, 2004; KANG et al., 2006).

2.4.4 Criopreservação de Orquídeas

Pesquisas sobre criopreservação de orquídeas tem sido intensificadas nos últimos tempos. Para isso, diferentes materiais vegetais têm sido utilizados, como por exemplo: sementes (GALDIANO JUNIOR. et al., 2012; SURENCISKI et al., 2012), protocormos (VENDRAME; FARIA, 2011), pólen (CARVALHO, 2006), embriões zigóticos (ISHIKAWA et al., 1997) e suspensão celular (TSUKASAKI et al., 2000).

Vendrame e Faria (2011) trabalhando com floroglucinol na criopreservação de protocormos de *Dendrobium nobile* Lindl., observaram que protocormos imersos em nitrogênio líquido sem pré-tratamento crioprotetor não sobreviveram e que o tratamento com a combinação de glicerol 2M por 20 minutos, seguido por PVS2 com floroglucinol 1% durante 10 minutos antes da imersão em nitrogênio líquido, promoveram os melhores resultados, com 68% de sobrevivência.

2.4.4.1 Criopreservação de sementes de orquídeas

De acordo com Pritchard e Seaton (1993) a criopreservação de sementes é uma estratégia importante para conservação de espécies de orquídeas em extinção ou de interesse para o melhoramento, pois, acarreta menos gastos e necessita de pouco espaço.

As sementes de orquídeas apresentam comportamento semelhante aos das sementes ortodoxas e, como tais, são fisiologicamente afetadas pelas condições de armazenamento, incluindo as de criopreservação (PRITCHARD; POYNTER; SEATON, 1999). O ponto crítico na criopreservação de sementes ortodoxas é definir o grau de umidade ideal antes da imersão em nitrogênio líquido.

Para se escolher o método de conservação a ser utilizado deve-se levar em conta o custo da implantação e manutenção, a mão de obra e a longevidade que se deseja alcançar (TOWILL, 2000, 2002).

Sementes de 30 espécies de orquídeas foram armazenadas a -10°C. Foi observado que após três anos estas sementes permaneciam viáveis, porém após 10 anos, todas as sementes estavam mortas (PRITCHARD, 1986). Seaton e Hailes (1989) verificaram que após 50 dias de armazenamento a -18°C sementes de *Cattleya aurantiaca* (Bateman ex Lindl.) P.N.Don perderam sua viabilidade, enquanto que, Thornhill e Koopowitz (1992), verificaram que mesmo após 400 dias de armazenamento nas mesmas condições, sementes dessa mesma espécie permaneciam viáveis.

Em estudo sobre a conservação de orquídeas nativas do cerrado, Mello (2000), observou que quando armazenadas em nitrogênio líquido ocorreu a manutenção da viabilidade das sementes mostrando que é uma técnica viável para conservação dessas orquídeas. Sementes desidratadas de *Dendrobium candidum* Wall. ex Lindl. (WANG et al., 1998) e de *Bratonia* (POPOVA; NIKISHIRA, 2003), colocadas diretamente em nitrogênio líquido, apresentaram altas porcentagens de germinação.

O método de vitrificação tem sido o mais estudado pelos pesquisadores por ser rápido e de baixo custo. Galdiano Junior et al. (2012), trabalhando com híbrido de *Dendrobium*, observaram que os tratamentos utilizando PVS2 com floroglucinol 1% e PVS2 com floroglucinol 1% e Supercool X1000 foram os que apresentaram maior porcentagem de sementes viáveis após a criopreservação.

Criopreservando sementes imaturas de *Cyrtopodium hatschbachii* Pabst pelo método do encapsulamento-desidratação, foi relatado que a viabilidade das sementes não foi afetada pelo congelamento e que os melhores resultados foram obtidos com pré-tratamento em sacarose (SURENCISKI et al., 2012).

De acordo com Thammasiri (2000) sementes de *Doritis pulcherrima* Lindl. tratadas com PVS2, em temperatura ambiente e congeladas em nitrogênio líquido apresentaram germinação de 62%, enquanto que as sementes colocadas diretamente no nitrogênio líquido sem a desidratação em solução de PVS2, não germinaram.

Hirano, Ishikawa e Mii (2005), utilizando o método de vitrificação em sementes imaturas de *Ponerorchis graminifolia* var. *suzukiana* (Ohwi) Soó, obtiveram 86% de sementes viáveis quando tratadas com PVS2 por 60 minutos antes da criopreservação. Hirano et al. (2005) em trabalho com sementes imaturas,

com idades variando de dois a seis meses de *Bletilla striata* (Thunb.) Rchb.f., pré-tratadas com PVS2 a 0°C por duas horas, obtiveram com sementes de quatro meses de idade maior porcentagem de germinação (78%), do que as colocadas diretamente em nitrogênio líquido (32%).

Segundo Nikishina et al. (2007), as taxas de germinação de sementes após a sua exposição ao nitrogênio líquido são dependentes das espécie. Nikishina et al. (2001), utilizando a criopreservação em sementes de *Asparagus officinallis* L., observaram que nos estágios iniciais de germinação é preferível a ausência de luz para melhor satisfazer as exigências fisiológicas.

Estudo com *Vanda coerulea* Griff. ex Lindl. mostra o sucesso na criopreservação utilizando o método da vitrificação, pois cerca de 67% das sementes tratadas com PVS2 por 70 minutos foram capazes de desenvolver plântulas normais, sendo que, as não tratadas com PVS2 não germinaram (THAMMASIRI; SOAMKUL, 2007).

O sucesso da criopreservação pelo método da vitrificação é destacado em sementes das orquídeas *Doritis pulcherrima* Lindl. (THAMMASIRI, 2000) *Dendrobium candidum* Wall. ex Lindl. (WANG et al., 2011), híbridos de *Dendrobium* (VENDRAME; CARVALHO; DIAS, 2007), *Phaius tankervilleae* (Banks) Blume (HIRANO et al., 2009) e espécies de *Cymbidium* (HIRANO et al., 2011).

A vitrificação em gotículas é uma modificação do método de vitrificação. São microgotas do crioprotetor colocadas em uma faixa de folha de alumínio, no qual os explantes são congelados e posteriormente aquecidos. As folhas se tornam um local para fácil alocação de grande número de germoplasma e submersão ao nitrogênio líquido. Além disso, a folha de alumínio é um bom condutor de calor e muito importante para o congelamento das amostras, etapa que deverá ser rápida a fim de evitar o efeito danoso da formação de cristais de gelo que pode ocorrer durante esta fase (PANIS; PIETTE; SWENNEN, 2005; SAKAI; ENGELMANN, 2007; ENGELMANN, 2011).

REFERÊNCIAS

- AI, P-F.; LU, L-P.; SONG, J-J. Cryopreservation of in vitro-grown shoot-tips of *Rabdosia rubescens* by encapsulation-dehydration and evaluation of their genetic stability. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.108, n.3, p.381-387. 2012.
- ALLEM, A.C. Managing genebanks: seed base collection examined. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v.48, p.321-328, 2001.
- ARDITTI, J. **Fundamentals of orchid biology**. John Wiley & Sons, New York, 1992.
- BACHIRI, Y.; GAZEAU, C.; HANSZ, J.; MORISSET, C.; DEREUDDRE, J. Successful cryopreservation of suspension cells by encapsulation-dehydration. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.43, p.241-248, 1995.
- BAJAJ, Y.P.S. Cryopreservation of plant cell, tissue, and organ culture for the conservation of germplasm and biodiversity. In: Bajaj, Y.P.S. **Biotechnology in Agriculture and Forestry**. Berlim: Springer, 1995. p.3-28.
- BARROS, F.; VINHOS, F.; RODRIGUES, V.T.; BARBERENA, F.F.V.A.; FRAGA, C.N. Orchidaceae. In: FORZZA, R.C. et al (Org.). **Catálogo de plantas e Fungos do Brasil**. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2010. v.2, p.1344- 1426.
- BARROS, D.I.; DIAS, D.C.F.S.; BHERING, M.C.; DIAS, L.A.S.; ARAÚJO, E.F. Uso do teste de tetrazólio para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de abobrinha. **Revista Brasileira de Sementes**, v.27, n.2, p.165-171, 2005.
- BENSON, E.E.; BREMNER, D. Oxidative stress in the frozen plant: a free radical point of view. In: FULLER, B.J.; LANE, N.; BENSON, E.E. **Life in the Frozen State**. Boca Raton: CRC Press. 2004. p.205–241.
- BIAN, H.; WANG, J.; LIN, W.; HAN, N.; ZHU, M. Accumulation of soluble sugars, heat-stable proteins and dehydrins in cryopreservation of protocorm-like bodies of *Dendrobium candidum* by the air-drying method. **Plant Physiology**, v.159, p.1139-1145, 2002.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Instrução Normativa nº06, de 19 de setembro de 2008 Reconhece como espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção aquelas constantes do Anexo I a esta Instrução Normativa. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 24 set. 2008.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 2009. p.399.
- CASTRO, S.V.; CARVALHO, A.A.; SILVA, C.M.G.; FAUSTINO, L.R.; FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R. Agentes Crioprotetores intracelulares: características e utilização na criopreservação de tecido ovariano e oócitos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.39, n.2, p.957. 2011.

CARVALHO, V. S. **Criopreservação de sementes e pólen de orquídeas**. 2006. 82f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 2006.

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.

CONDELLO, E.; ANDRÉS, E., PIETTE, B., DRUART, P., CABONI, E.; PANIS, B. Improvement of the cryopreservation of apple through the droplet vitrification method. **Cryo letters**, v.30, n.5, p.395-396, 2009.

COSTA, C.J. **Armazenamento de sementes é forma segura de conservação da diversidade genética**. 2014. Disponível em: <<http://www.abrates.org.br/portal/noticias/121-armazenamento-de-sementes-e-forma-seguraa-de-conservacao-da-diversidade-genetica>>. Acesso em: 23 julho 2014.

DEMIRALAY, A.; YALCIN-MENDI, Y.; AKA-KACAR, Y.; CETINER, S.; AKSOY, U.; FERGUNSON, L.; HEPKSOY, S. In vitro propagation of *Ficus carica* L. var. Bursa Siyahi throughout meristem culture. **Acta Horticulturae**, v.480, p.165-167, 1998.

DEREUDDRE, 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'alginate, à une déshydratation puis à une congélation dans l'azote liquide: Effet d'un durcissement préalable au froid. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences**, v.3. p.317-323, 1990.

DRESSLER, R.L. How many orchid species?, **Selbyana**, v. 26, p.155-158, 2005.

DRESSLER, R.L. **The Orchids - Natural history and classification**. Cambridge: Harvard University Press. 1990. 332p.

ENGELMANN, F. Importance of desiccation for the cryopreservation of recalcitrant seed and vegetatively propagated species. **Plant Genetic Resources Newsletter**, Itália, 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.

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.; ASSIS, A.M.; UNEMOTO, L.K.; CARVALHO, J.F.R.P. **Produção de Orquídeas em Laboratório**. Londrina: Mecenas, 2012. 124p.

FARIA, R.T.; SANTIAGO, D.C.; SARIDAKIS, D.P.; ALBINO, U.B.; ARAÚJO, R. Preservation of the brazilian orchid *Cattleya walkeriana* Gardner using *in vitro*

propagation. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.2, n.3, p.489-492, 2002.

FRANÇA NETO, J.B.; O Teste de Tetrázólio em Sementes de Soja. In: VIEIRA, R.D.; CARVALHO, N.M. (Org.). **Teste de vigor em semetes**. Jaboticabal: FUNEP, 1994. p.87-103.

FRANCESCHI, C.R.B. **Conservação de sementes e micropropagação de orquídeas da Mata Atlântica utilizando a técnica "Thin Cell Layer"**. 2013. 112fls. Dissertação (Pós-graduação em Botânica) - Universidade Federal do Paraná, UFPR, Curitiba, 2013.

FRANKS, F. The properties of aqueous solutions at subzero temperatures. In: FRANKS, F. **Water: a comprehensive treatise**. New York: Plenum Press, 1982, p. 215-218.

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.

GANINO, T.; SILVIANI, A.; BEGHE, D.; BENELLI, C.; LAMBARDI, M.; FABBRI, A. Anatomy and osmotic potential of the *Vitis* rootstock shoot tips recalcitrant to cryopreservation. **Biologia Plantarum**, v.56, n.1, p.78-82. 2012.

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

GOUDARZI, R.; MAJEDI, A.; TALAIE, A.R.; MOSTAFAVI, M. Micropropagation of cherry rootstock (*Prunus avium* cv. F12/1) by shoot tip culture. **Iranian Journal of Agricultural Sciences**, v.28, p.133–143. 1997.

GUZMAN, E.; PANIS, B.; BRADAI, B.F.; SÁNCHEZ-ROMERO, C. Cryopreservation of avocado embryogenic cultures. **Acta Horticulturae**, v.908, p.215-218, 2009.

HIRANO, T.; YUKAWA, T.; MIYOSHI, K.; MII, M. Wide applicability of cryopreservation with vitrification method of seeds of some *Cymbidium* species. **Plant Biotechnology**, v.28, p.99-102, 2011.

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

HIRANO, T.; GOGO, T.; MII, M.; ISHIKAWA, K. Cryopreservation of immature seeds of *Bletilla striata* by vitrification. **Plant Cell Reports**, v.23, p.534-539, 2005.

HIRANO, T.; ISHIKAWA, K.; MII, M. Cryopreservation of immature seeds of *Ponerorchis graminifolia* var. *suzukiana* by vitrification. **Cryo Letters**. v.26, n.3, p.139-146, 2005.

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 Cattley (Ochidaceae)**. 2012. 57fls. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade do Oeste Paulista, UNOESTE, Presidente Prudente. 2012.

HOSSAIN, M.M. Asymbiotic seed germination and in vitro seedling development of *Epidendrum ibaguense* Kunth. (Orchidaceae). **African Journal of Biotechnology**, v.7, n. 20, p.3614-3619, 2008.

ISHIKAWA, K.; HARATA, K.; MII, M.; SAKAI, A.; YOSHIMATSU, K.; SHIMOMURA, K. Cryopreservaton of zygotic embryos of a Japanese terrestrial orchid (*Bletilla striata*) by vitrification. **Plant Cell Reports**, v.16, p.754-757, 1997.

JAMES, D.J. The role of auxins and phloroglucinol in adventitious root formation in *Rubus* and *Fragaria* grown in vitro. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v.54, p.273–277. 1997.

JAMES, D.J. Adventitious root formation in vitro in apple root stocks (*Malus pumila*). I. Factors affecting the length of the auxin-sensitive phase in M9. **Physiologia Plantarum**, v.57, p.149–153. 1983.

JAMES, D.J.; THURBON, I.J. Shoot and root initiation in vitro in the apple rootstock M9 and the promotive effects of phloroglucinol. **Journal of Horticultural Science**, v.56, p.15–20. 1981.

JONES, O.P. Effect of phloridzin and phloroglucinol on apple shoots. **Nature**, v.262, p.392–393. 1976.

JUNGHANS, T.G.; SOUZA, A.S. **Aspectos práticos da micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2009. 385p.

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**, v.97, p.609–620, 2006.

KARTHA, K.K. Meristem culture and germplasm preservation. In: KARTHA, K.K. **Cryopreservation of plant cells and organs**. Florida: CRC Press, 1985. p.115-134.

KNUDSON, L. Further onservations on nonsymbiotic germination of orchid seeds. **Botanical Gazette**, v.77, p.212-219, 1924.

KOPOWITZ, H. **Orchids and their conservation**. Portland, Oregon: Timber Press, 2001. 177p.

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: 23 de jul. 2014.

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

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

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.

MARTINS, L.; LAGO, A.A.; ANDRADE, A.C.S.; SALES, W.R.M. Conservação de Sementes de ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa* (Mart. Ex DC.) Standl.) em nitrogênio líquido. **Revista Brasileira de Sementes**, v.31, n.2. p.71-76, 2009.

MELLO, C.M.C. **Conservação de sementes de orquídeas do cerrado**. 2000. 48fls. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Brasília, Brasília. 2000.

MOLINA, T.F.; TILLMANN, M.A.A.; DODE, L.B.; VIÉGAS, J. Criopreservação em sementes de cebola. **Revista Brasileira de Sementes**, v.28, n.3. 2006.

MOTTA, L.B.; ZANOTTI, R.F.; SILVA, A.I.S.; LEITE, I.T.A.; CUZZUOL, G.R.F. Criopreservação de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (Pau-Brasil). In.: Congresso de Ecologia do Brasil, n.8, 2007, Caxambu. **Anais...** Caxambu. p.1-2. 2007.

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.

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.YU.; POPOV, A.S. Cryopreservation of seeds and protocorms of rare temperate orchids. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 54, p.121-127, 2007.

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.

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.

OLIVEIRA, L.M.; CARVALHO, M.L.N.; DAVIDE, A.C. Teste de tetrazólio para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de *Peltophorum dumbium* (Sprengel) Taubert – Leguminosae Caesalpinioideae. **Revista Cerne**, v.11, n.2, p.159-106, 2005.

PANIS, B.; PIETTE, B.; SWENNEN, R. Droplet vitrification of apical meristems: a cryopreservation protocol applicable to all *Musaceae*. **Plant Science**, v.168, p.45-55, 2005.

PANIS, B.; LAMBARDI, M. Status of cryopreservation Technologies in plants (crops and forest trees). **The Role of Biotechnology**, p.43-54. 2006.

PAULET, F.; ENGELMANN, F.; GLAZMANN, J.C. Cryopreservation of apices of *in vitro* plantlets of sugarcane (*Saccharum* sp.) hybrids using encapsulation-dehydration. **Plant Cell Reports**. v.12, p.525-529, 1993.

PINHO, D.S.; BORGES, E.E.L.; CARVALHO, A.P.V.; CORTE, V.B. Adequação da metodologia do teste de tetrazólio para avaliação da viabilidade de sementes de angico. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v.31, n.67, p.269-272, 2011.

POPOVA, E.V.; NIKISHINA, T.V. The effect of seed cryopreservation on the development of protocorms by the hybrid orchid *Bratonia*. **Russian Journal of Plant Physiology**, v.50, n.5, p.672-677, 2003.

PRITCHARD, H.W.; SEATON, P.T. Orchid seed storage: historical perspective, current status, and future prospects for long-term conservation. **Selbyana**, v.14, p.89-104, 1993.

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, n.2, p.92-101, 1999.

PRITCHARD, H.W.; PRENDERGAST, F.G. Factors influencing the germination and storage of orchid pollen. In: PRITCHARD, H.W. **Modern methods in orchid conservation: the role of physiology ecology and management**. Cambridge: Cambridge University Press, 1989. p.1-16.

PRITCHARD, H.W. Orchid seed storage at the Royal Botanic Gardens, Kew, England. 2. Physiology Unit, Wakehurst Place. **Orchid Research Newsletter**, v.7, p.18, 1986.

RALL, W.F.; REID, D.S.; POLGE, C. Analysis of slow-warming injury of mouse embryos by cryomicroscopical and physiochemical methods. **Cryobiology**. v.21, p.106-121, 1984.

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_Morfologicos_e_Taxonomicos_Vinicius_Trettel_Rodrigues.pdf> Acesso em: 24 de jun. 2014.

SAKAI, A. Cryopreservation of germplasm of woody plants. In: Bajaj, Y.P.S. (Ed.) **Biotechnology in agriculture and forestry. Cryopreservation of plant germplasm I**. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 1995, v.32, p 53-69.

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

SAKAI, A.; ENGELMANN, F. Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet vitrification: a review. **Cryoletters**, v. 28, p.151-172. 2007.

SÁNCHEZ-ROMERO, C.; SWENNEN, R.; PANIS, B. Cryopreservation of olive embryogenic cultures. **CryoLetters**, v.30, n.5, p.359-372, 2009.

SANT, R.; PANIS, B.; TAYLOR, M.; TYAGI, A. Cryopreservation of shoot-tips by droplet vitrification applicable to all taro (*Colocasia esculenta* var. *esculenta*) accessions. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.92, p.107-111. 2008.

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

SANTOS, H.O. **Conservação de Sementes de Mamona (*Ricinus communis* L.)**. 2010. 85fls. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras. 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 Organ Culture**, v.60, p.139–149. 2000.

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, 1989. p.17-29.

SHARAF, S.A.; SHIBLI, R.A.; KASRAWI, M.A.; BAGHDADI, S.H. Cryopreservation of wild Shih (*Artemisia herba-alba* Asso.) shoot-tips by encapsulation-dehydration and encapsulation-vitrification. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.108, n.3, p.437-444, 2012.

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

SILVA, D.M. **Micropropagação e Citogenética de *Cyrtopodium saintlegerianum* Rchb. f. (Orchidaceae: Cyrtopodiinae)**. 2012. 95fls. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2012.

SIMIONE, F.P. **Cryopreservation manual**. Nalge Nunc International Corp. 1998. 8p.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. Botânica sistemática – Guia ilustrado para identificação das fanerógamas nativas e exóticas do Brasil, baseado em APG II. 2. **Instituto Plantarum**, p.114-138, 2008.

STEPONKUS, P.L.; WEBB, M.S. Freezeinduced dehydration and membrane destabilization in plants. In: SOMERO, G.N.; OSMOND, C.B.; BOLIS, C.L. **Water and life: comparative analysis of water relationships at the organismic, cellular and molecular level**. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 1992. p.338-362.

- 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.; FLACHSLAND, E.A.; TERADA, G.; MROGINSKI, L.A.; REY, H.Y. Cryopreservation of *Cyrtopodium hatschbachii* Pabst (Orchidaceae) immature seeds by encapsulation-dehydration. **Biocell**, v.36, n.1, p.31-36, 2012.
- THAMMASIRI, K. Cryopreservation of seeds of a Thai orchid (*Doritis pulcherrima* Lind.) by vitrification. **Cryo Letters**, v.21, p.237-244, 2000.
- THAMMASIRI, K.; SOAMKUL, L. Cryopreservation of *Vanda coerulea* Griff. ex Lindl. **ScienceAsia**, v.33, p.223-227, 2007.
- THORNHILL, A.; KOPOWITZ, H. Viability of *Disa uniflora* Berg (Orchidaceae) seeds under variable storage conditions: Is orchid gene banking possible? **Biological Conservation**, v.62, p.21-27, 1992.
- TOWILL, L.E. Germplasm preservation. In: TRIGIANO, R.N.; GRAY, D.J. **Plant tissue culture concepts and laboratory exercises**. Boca Raton: CRC Press, p. 2000, p.337-353.
- TOWILL, L.E. Cryopreservation of plant germplasm. In: TOWILL, L.E.; BAJAJ, Y.P.S. **Cryopreservation of plant germplasm II. Biotechnology in Agriculture and Forestry**. Berlin: Springer, v.50, p.4-21. 2002.
- TSUKAZAKI, H.; MII, M.; TOKUHARA, K.; ISHIKAWA, K. Cryopreservation of *Doritaenopsis* suspension culture by vitrification. **Plant Cell Reports**, v.19, p.1160-1164, 2000.
- VENDRAME, W.A.; FARIA, R.T; SORACE, M.; SAHYUN, S.A. Orchid Cryopreservation. **Ciência e Agrotecnologia**, v.38, n.3, p.213-229, 2014.
- VENDRAME, W.A.; FARIA, R.T. Phloroglucinol enhances recovery and survival of cryopreservation *Dendrobium nobile* protocorms. **Scientia Horticulturae**. v.128, p.131-135, 2011.
- 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.
- VIEIRA, M.L.C. Conservação de germoplasma in vitro. **Biociência, Ciência e Desenvolvimento**, v.14, p.18-20, 2000.
- WANG, R.X.; SONG, X.Q.; HE, M.G.; SONG, S.Q. Developmental changes of cryotolerance associated with stored reserve accumulation of *Doritis pulcherrima* (Orchidaceae) seeds. **Seed Science and Technology**, v.39, p.271-281, 2011.
- WANG, J.H.; GE, J.G.; LIU, F.; BIAN, H.W.; HUANG, C.N. Cryopreservation of seeds and protocorms of *Dendrobium candidum*. **Cryo Letters**, v.19, p.123-128, 1998.

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.

3 ARTIGOS

3.1 ARTIGO A: SOLUÇÕES CRIOPROTETORAS NA CRIOPRESERVAÇÃO DE SEMENTES DE ORQUÍDEAS BRASILEIRAS

3.1.1 Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência do uso de soluções crioprotetoras em sementes das orquídeas *Cattleya labiata* Lindl. e *Miltonia regnelli* Rchb.f., submetidas à criopreservação em nitrogênio líquido. Os tratamentos consistiram da imersão das sementes em soluções crioprotetoras e de vitrificação antes da imersão em nitrogênio líquido (NL) (-196 °C), conforme os tratamentos a seguir: T1 - controle; T2 - glicerol 2M (20 min); T3 - sacarose 0,4M (20 min); T4 - glicerol 2M (20 min) + sacarose 0,4M (20 min); T5 - glicerol 2M (20 min) + PVS2 (10 min); T6 - glicerol 2M (20 min) + PVS2 com floroglucinol a 1% (10 min); T7 - sacarose 0,4M (20 min) + PVS2 (10 min); T8 - sacarose 0,4M (20 min) + PVS2 com floroglucinol a 1% (10 min); T9 - glicerol 2M (20 min) + sacarose 0,4M (20 min) + PVS2 (10 min); T10 - glicerol 2M (20 min) + sacarose 0,4M (20 min) + PVS2 com 1% de floroglucinol (10 min). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5%. Nas sementes de *Cattleya labiata* Lindl. do tratamento T1 apresentaram maior percentual de viabilidade, atingindo o valor de 99% de sementes viáveis, enquanto as dos tratamentos T2 e T3 foram as que tiveram os menores valores, 41 e 32%, respectivamente. As sementes de *Miltonia regnelli* Rchb.f., tiveram redução considerável da viabilidade na maioria dos tratamentos, quando comparadas à viabilidade inicial. As sementes do tratamento T1 foram as que apresentaram o maior percentual de sementes viáveis após o descongelamento, 83%. Enquanto que as sementes submetidas aos tratamentos T3, T4, T7 e T8 não registraram sementes viáveis. Para a criopreservação de sementes das orquídeas brasileiras *Cattleya labiata* Lindl. e *Miltonia regnelli* Rchb.f. não é necessário o uso de crioprotetores.

Palavras-chave: Nitrogênio líquido. Viabilidade. *Cattleya labiata* Lindl.. *Miltonia regnelli* Rchb.f..

CRYOPROTECTANTS SOLUTIONS IN CRYOPRESERVATION OF BRAZILIAN ORCHIDS SEED

Abstract

The objective of this study was to evaluate the efficiency of the use of cryoprotectant solutions in seeds of *Cattleya labiata* Lindl. and *Miltonia regnelli* Rchb.f. orchids, submitted to cryopreservation in liquid nitrogen. The treatments consisted of immersing the seeds in cryoprotectant solutions and vitrification before immersion in liquid nitrogen (NL) (-196 ° C), according to the following treatments: T1 - control; T2 - glycerol 2M (20 min); T3 - saccharose 0.4M (20 min); T4 - glycerol 2M (20 min) + saccharose 0.4 M (20 min); T5 - glycerol 2M (20 min) + PVS2 (10 min); T6 - glycerol 2M (20 min) + PVS2 with phloroglucinol at 1% (10 min); T7 - saccharose 0.4 M (20 min) + PVS2 (10 min); T8 - saccharose 0.4M (20 min) + PVS2 with phloroglucinol at

1% (10 min); T9 - glycerol 2M (20 min) + saccharose 0.4 M (20 min) + PVS2 (10 min); T10 - glycerol 2M (20 min) + saccharose 0.4 M (20 min) + PVS2 with 1% phloroglucinol (10 min). The data were submitted to analysis of variance (ANOVA) and average compared by the test of Tukey at 5%. In *Cattleya labiata* Lindl. seeds, the T1 treatment seeds, which did not pass by pretreatment with cryoprotectant solutions, presented a higher percentage of viability, reaching a value of 99% of viable seeds. While the T2 and T3 treatments were those that had the lowest values, 41 and 32%, respectively. The *Miltonia regnelli* seeds, had considerable reduction of viability in most treatments, when compared to the initial viability. The T1 treatment seeds were those with the highest percentage of viable seeds after thawing, 83%. While seeds submitted to the treatments T3, T4, T7 and T8 reported no viable seeds. For cryopreservation of Brazilian *Cattleya labiata* Lindl. and *Miltonia regnelli* Rchb.f. orchids seeds the use of cryoprotectants is not necessary.

Keywords: Liquid nitrogen. Viability. *Cattleya labiata* Lindl.. *Miltonia regnelli* Rchb.f..

3.1.2 Introdução

As orquídeas produzem milhares de sementes e estão entre as de menor tamanho, porém sua comercialização não ocorre, devido a particularidades das condições de germinação (FARIA et al., 2012). As sementes de orquídeas apresentam comportamento semelhante aos das sementes ortodoxas e, como tais, são fisiologicamente afetadas pelas condições de armazenamento, incluindo as de criopreservação (PRITCHARD E SEATON, 1993; PRITCHARD; POYNTER; SEATON, 1999; PRITCHARD E PRENDERGAST, 1989).

Devido à contínua destruição dos habitats naturais, comércio ilegal, ação de colecionadores de orquídeas e a sua lenta multiplicação por vias naturais de propagação muitas espécies estão desaparecendo (HOSSAIN, 2008; JUNGHANS e SOUZA, 2009). Para a conservação de orquídeas, são necessárias estratégias à longo prazo, sendo que bancos de semente tem se mostrado uma boa opção para conservação *ex situ*.

A criopreservação em nitrogênio líquido é um método de conservação de material biológico em temperaturas extremamente baixas, de -196°C na fase líquida ou -150 °C em sua fase de vapor, mantendo as características originais do material após o descongelamento (SANTOS, 2000). Em temperaturas ultrabaixas, os únicos estados físicos que existem são o cristalino e o vítreo, sendo que, em ambos o metabolismo é praticamente nulo (KARTHA, 1985).

A vitrificação é a técnica mais utilizada para criopreservação. Nessa técnica ocorre desidratação dos tecidos, em fluxo laminar ou dessecador com sílica

gel, ou então por tratamento com soluções químicas altamente concentradas de crioprotetores, tais como dimetilsulfóxido (DMSO), etileno glicol, metanol, glicerol, propileno glicol, sacarose, trealose e glucose, até um grau de umidade em que não existe água livre para a cristalização antes de mergulharem em nitrogênio líquido (KARTHA, 1985; SAKAI, 1995).

Segundo Vendrame et al. (2014), um dos problemas enfrentados durante o processo de criopreservação são os danos sofridos pelas células, devido a desidratação e aumento da concentração de soluto além da formação de cristais de gelo que causam o rompimento destas membranas e conseqüentemente a morte da célula. Assim, com a descoberta de substâncias chamadas crioprotetoras, capazes de proteger as células de possíveis injúrias, fez com que a técnica de criopreservação obtivesse um grande avanço e sucesso com os resultados.

As substâncias crioprotetoras são classificadas em intracelulares e extracelulares. As intracelulares são solventes orgânicos de baixo peso molecular que possuem a capacidade de penetrar na célula (RALL; REID; POLGE, 1984), como por exemplo, propilenoglicol, etilenoglicol, glicerol e DMSO. As extracelulares são substâncias que não penetram na célula e são responsáveis pela desidratação causada por uma maior concentração de solutos no meio externo da célula (FRANKS, 1982), como por exemplo, sacarose, amido, polivinilpirrolidona (PVP) e óxido de polietileno.

O floroglucinol (1,3,5-tri-hidroxibenzeno) é um benzenotriol conhecido pela sua propriedade de regulador de crescimento (SARKAR e NAIK, 2000). É também conhecido por proteger as células contra danos oxidativos por radicais livres e por possuir efeito crioprotetor contra o stresse oxidativo e metabólitos relacionados (BENSON e BREMNER, 2004; KANG et al, 2006).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência do uso de soluções crioprotetoras em sementes das orquídeas *Cattleya labiata* Lindl. e *Miltonia regnelli* Rchb.f., submetidas à criopreservação em nitrogênio líquido.

3.1.3 Material e Métodos

O experimento foi realizado no laboratório de Fitotecnia, setor de criopreservação, do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Londrina (UEL) – PR.

Cápsulas maduras de sementes das orquídeas *Cattleya labiata* Lindl. e *Miltonia regnelli* Rchb.f. Rchb. f. foram obtidas por polinização artificial de plantas cultivadas em estufa. As cápsulas maduras foram coletadas e a superfície esterilizada numa solução de hipoclorito de sódio a 3% durante 20 min, sob uma câmara de fluxo laminar estéril. As cápsulas esterilizadas foram dissecadas, usando um bisturi, as sementes removidas da cápsula, avaliadas quanto ao grau de umidade, a viabilidade por meio do teste de tetrazólio e submetidas aos tratamentos e a criopreservação.

O grau de umidade inicial das sementes obtido pelo método gravimétrico com a utilização de estufa a $105 \pm 3^{\circ}\text{C}$, baseado no peso da água removida das sementes durante sua permanência na estufa por 24 horas. Para isso foi feita a média aritmética de quatro sub-amostras de 0,001 g de sementes, os resultados foram obtidos conforme Equação 1:

$$\%U = \frac{100(P - p)}{P - t}$$

Onde:

U – grau de umidade em porcentagem de base úmida (b.u). %

P – peso inicial, peso do recipiente e sua tampa mais o peso da semente úmida;

p – peso final, peso do recipiente e sua tampa mais o peso da semente seca;

t – tara, peso do recipiente com sua tampa.

No teste de tetrazólio, as sementes foram previamente embebidas durante 24 horas em água destilada a 25°C , em seguida imersas em solução aquosa de 1% de sal de tetrazólio (cloreto de 2,3,5 trifenil tetrazólio) e mantidas na ausência de luz a 30°C , durante 24 horas. A contagem foi realizada ao microscópio estereoscópico Motic, considerando-se como viáveis as sementes portadoras de embriões coloridos de vermelho (LAUZER; ST-ARNAUD; BARABÉ, 1994). Para o cálculo da porcentagem de sementes viáveis não foram consideradas sementes vazias, ou seja, que não apresentavam embrião. No início do experimento o lote das sementes de *Cattleya labiata* Lindl. apresentava 9% de grau de umidade e 98% de viabilidade, enquanto que das sementes de *Miltonia regnelli* Rchb.f. apresentavam 8% de grau de umidade e 47% de viabilidade.

Para cada tratamento, 50mg de sementes foram colocadas em criotubos contendo 1 mL de uma solução de composição diferente (glicerol 2M,

sacarose 0,4M isoladamente, ou a mistura glicerol 2M com sacarose 0,4M durante 20 min a 25°C, como descrito por Nishizawa et al. (1993). Em seguida, foi adicionada uma solução de vitrificação de planta conhecida como PVS2, durante 10 min a 0°C (SAKAI; KOBAYASHI; OIYAMA, 1990). O PVS2 é composto de 30% (v/v) de glicerol, 15% (v/v) de etilenoglicol, 15% (v/v) dimetil sulfóxido (DMSO) e sacarose 0,4M.

Os tratamentos consistiram da imersão de sementes em diferentes soluções crioprotetoras e soluções de vitrificação, respectivamente, com ou sem floroglucinol 1%, antes da imersão em nitrogênio líquido (NL) a -196° C:

T1 - controle: sem sacarose, sem glicerol, sem PVS2, sem floroglucinol

T2 - glicerol 2M (20 min)

T3 - sacarose 0,4M (20 min)

T4 - glicerol 2M (20 min) + sacarose 0,4M (20 min)

T5 - glicerol 2M (20 min) + PVS2 (10 min)

T6 - glicerol 2M (20 min) + PVS2 com floroglucinol a 1% (10 min)

T7 - sacarose 0,4M (20 min) + PVS2 (10 min)

T8 - sacarose 0,4M (20 min) + PVS2 com floroglucinol a 1% (10 min)

T9 - glicerol 2M (20 min) + sacarose 0,4M (20 min) + PVS2 (10 min)

T10 - glicerol 2M (20 min) + sacarose 0,4M (20 min) + PVS2 com 1% de floroglucinol (10 min).

Após 15 dias em nitrogênio líquido, os criotubos foram removidos e reaquecidos a 40°C em banho de água durante 1,5 min. As soluções de criopreservação foram removidas dos criotubos com auxílio de uma pipeta de Pasteur, sob câmara de fluxo laminar.

Uma parte das sementes foi submetida ao teste de tetrazólio para avaliação da porcentagem de sementes viáveis. Outra parte das sementes foi colocada para germinar em meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) com metade da concentração de macronutrientes. O pH foi corrigido com KOH para 5,8. O meio MS foi distribuído em frascos de vidro (40mL/frasco), estes foram fechados com tampa plástica e em seguida autoclavados a uma pressão de 105kg/cm² e temperatura de 121°C por 30 minutos (FARIA et al., 2012). Antes da semeadura, 10mg de cada lote de sementes foi desinfetado em solução de hipoclorito de sódio (0,5%) por 15 minutos em câmara e fluxo laminar e em seguida lavado com água

destilada e autoclavada. Gotejou-se 1,0mL das soluções contendo 10mg de sementes em 10mL de água sobre o meio MS nos frascos de vidro, estes foram tampados e vedados com filme de PVC e acondicionados em sala de crescimento com temperatura de 25°C, fotoperíodo de 16 horas e luminosidade $120 \text{ umol s}^{-1}\text{m}^{-2}$ proveniente de lâmpadas fluorescentes. Para cada tratamento de sementes foram semeados 10 frascos.

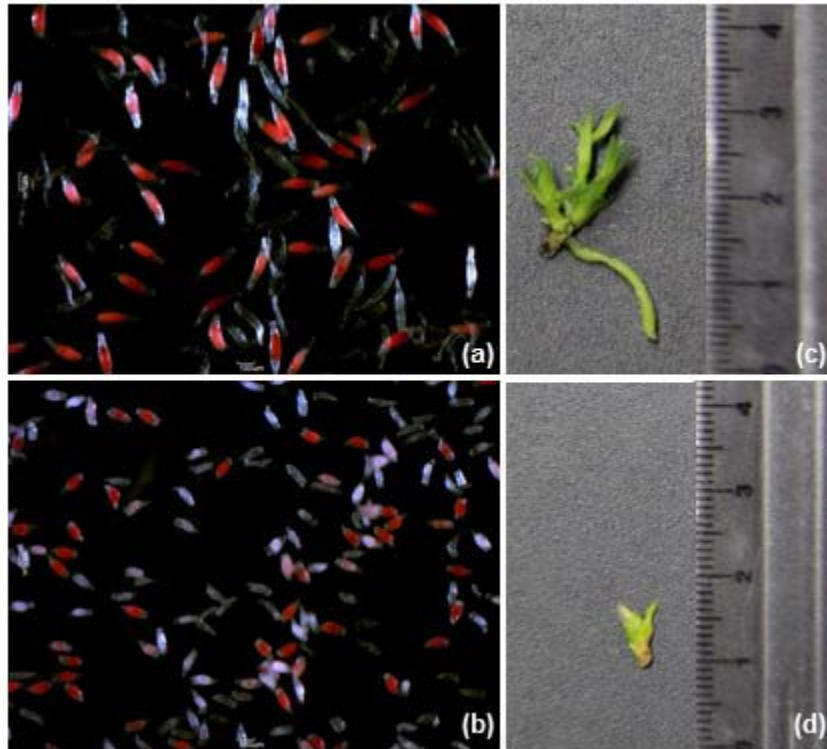
Depois de 90 dias, as sementes formando protocormos foram subcultivadas no meio MS (MURASHIGE E SKOOG, 1962), modificado com metade da concentração dos macronutrientes (1/2 MS). Após 150 dias foi determinada a percentagem de protocormos que sobreviveram ao subcultivo, massa fresca e seca de plântulas e, devido as características das plântulas, foi avaliado o número de brotos formados apenas nas plântulas de *Cattleya labiata Lindl.*

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 10 tratamentos e 10 repetições, com 10mg de sementes por tratamento. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5%.

3.1.4 Resultados e Discussão

Após o descongelamento parte das sementes foi submetida ao teste de tetrazólio para análise da viabilidade e outra parte foi colocada para germinar e dar origem as plântulas (Figura 3.1.1). Nas sementes de *Cattleya labiata Lindl.* as sementes do tratamento T1 apresentaram maior percentual de viabilidade do que as dos tratamentos T4, T5, T6 T7 e T8, atingindo o valor de 99% de sementes viáveis, em relação a viabilidade inicial. Enquanto que as dos tratamentos T2 e T3 foram as que tiveram os menores valores, 41 e 32%, respectivamente. Na avaliação de sobrevivência após o subcultivo, a porcentagem de sobrevivência se manteve alta para esta espécie, os tratamentos T6, T9 e T10 apresentaram 100% de sobrevivência, sendo superiores ao tratamento T2, mas não diferindo dos demais tratamentos (Tabela 3.1.1).

Figura 3.1.1 – Sementes criopreservadas em nitrogênio líquido e submetidas ao teste de tetrazólio: *Cattleya labiata* Lindl. (a) e *Miltonia regnelli* Rchb.f. (b); plântula oriunda de sementes submetidas a criopreservação em nitrogênio líquido pré-tratadas 150 dias após o subcultivo: *Cattleya labiata* Lindl. (c) e *Miltonia regnelli* Rchb.f. (d).



Fonte: Próprio autor

As sementes de *Miltonia regnelli* Rchb.f., tiveram redução considerável da viabilidade na maioria dos tratamentos, quando comparadas à viabilidade inicial. As sementes do tratamento T1, que não passaram por nenhum tratamento antes do congelamento em nitrogênio líquido foram as que apresentaram o maior percentual de sementes viáveis após o descongelamento, 83% em relação a viabilidade inicial. Enquanto que, as sementes submetidas aos tratamentos T3, T4, T7 e T8 não registraram sementes viáveis, e os demais tratamentos não atingiram valores superiores a 13% para esta variável. No subcultivo os tratamentos T1 e T6 tiveram 100% de sobrevivência, sendo superiores aos tratamentos T2, T5 e T9 com 80%, que por sua vez foram superiores ao tratamento T10 com 70% de sobrevivência (Tabela 3.1.1).

Tabela 3.1.1 – Porcentagem de sementes viáveis (SV) de *Cattleya labiata* Lindl. e *Miltonia regnelli* Rchb.f., pelo método do tetrazólio, tratadas com soluções crioprotetoras e submetidas à criopreservação em nitrogênio líquido e porcentagem de protocormos provenientes de sementes criopreservadas que se mantiveram vivos após 150 dias do subcultivo (PV).

Tratamentos	<i>Cattleya labiata</i> Lindl.		<i>Miltonia regnelli</i> Rchb.f.	
	SV (%)**	PV (%)	SV (%)***	PV (%)
T1	99 a*	95 ab*	83 a*	100 a*
T2	41 e	80 b	13 b	80 b
T3	32 e	91 ab	0 c	-
T4	72 d	98 ab	0 c	-
T5	84 bcd	89 ab	8 bc	80 b
T6	86 bc	100 a	4 bc	100 a
T7	80 cd	97 ab	0 c	-
T8	79 cd	96 ab	0 c	-
T9	91 abc	100 a	6 bc	80 b
T10	93 ab	100 a	4 bc	70 c
CV%	11,52	11,12	52,71	16,16

T1 - controle: sem glicerol, sem PVS2, sem floroglucinol; T2 - glicerol 2M (20 min); T3 - sacarose 0,4M (20 min); T4 - glicerol 2M (20 min) + sacarose 0,4M (20min); T5 - glicerol 2M (20 min) + PVS2 (10 min); T6 - glicerol 2M (20 min) + PVS2 com floroglucinol a 1% (10 min); T7 - sacarose 0,4M (20 min) + PVS2 (10 min); T8 - sacarose 0,4M (20 min) + PVS2 com floroglucinol a 1% (10 min); T9 - glicerol 2M (20 min) + sacarose 0,4M (20 min) + PVS2 (10 min); T10 - glicerol 2M (20 min) + sacarose 0,4M (20 min) + PVS2 com 1% de floroglucinol (10 min).

*Médias seguidas pelas mesmas letras na coluna, não diferem pelo teste Tukey, a 5%.

** A viabilidade inicial das sementes de *Cattleya labiata* Lindl. era de 98%

*** A viabilidade inicial das sementes de *Miltonia regnelli* Rchb.f. era de 47%

Fonte: Próprio autor

Após o período de 150 dias, as plântulas de *Cattleya labiata* Lindl. do tratamento T9 apresentaram valores de massa fresca superiores ao tratamento T5, sendo 0,077 e 0,035g, respectivamente, mas não diferenciaram dos demais tratamentos. Para a variável massa seca de plântula e número de brotos não houve diferença estatística significativa entre os tratamentos, os valores variaram de 0,006 a 0,012g de massa seca e de 0,63 a 1,53 para número de brotos. Para as plântulas de *Miltonia regnelli* Rchb.f. não houve diferença tanto para a variável massa fresca, com valores entre 0,008 e 0,016g, quanto para massa seca, com valores entre 0,0011 e 0,0022g (Tabela 3.1.2).

Tabela 3.1.2 – Massa fresca (g) (MFP) e massa seca (g) (MSP) de plântulas de *Cattleya labiata* Lindl. e *Miltonia regnelli* Rchb.f. e número de brotos (NB) de *Cattleya labiata* Lindl., tratadas com soluções crioprotetoras e submetidas à criopreservação em nitrogênio líquido.

Tratamentos	<i>Cattleya labiata</i> Lindl.			<i>Miltonia regnelli</i> Rchb.f.	
	MFP (g)	MSP (g)	NB	MFP (g)	MSP (g)
T1	0,059 ab	0,007 a*	1,41 a*	0,012 a*	0,0021 a*
T2	0,042 ab	0,011 a	0,63 a	0,007 a	0,0011 a
T3	0,049 ab	0,008 a	1,21 a	-	-
T4	0,068 ab	0,008 a	1,53 a	-	-
T5	0,035 b	0,006 a	0,63 a	0,013 a	0,0022 a
T6	0,049 ab	0,008 a	0,98 a	0,016 a	0,0021 a
T7	0,052 ab	0,009 a	1,11 a	-	-
T8	0,069 ab	0,012 a	1,42 a	-	-
T9	0,077 a	0,011 a	1,47 a	0,010 a	0,0022 a
T10	0,076 ab	0,010 a	1,46 a	0,008 a	0,0012 a
CV%	38,95	48,41	46,84	34,41	30,88

T1 - controle: sem glicerol, sem PVS2, sem floroglucinol; T2 - glicerol 2M (20 min); T3 - sacarose 0,4M (20 min); T4 - glicerol 2M (20 min) + sacarose 0,4M (20min); T5 - glicerol 2M (20 min) + PVS2 (10 min); T6 - glicerol 2M (20 min) + PVS2 com floroglucinol a 1% (10 min); T7 - sacarose 0,4M (20 min) + PVS2 (10 min); T8 - sacarose 0,4M (20 min) + PVS2 com floroglucinol a 1% (10 min); T9 - glicerol 2M (20 min) + sacarose 0,4M (20 min) + PVS2 (10 min); T10 - glicerol 2M (20 min) + sacarose 0,4M (20 min) + PVS2 com 1% de floroglucinol (10 min).

*Médias seguidas pelas mesmas letras na coluna, não diferem pelo teste Tukey, a 5%.

Fonte: Próprio autor

A criopreservação é uma estratégia importante na conservação de sementes de orquídeas. As sementes de orquídeas apresentam comportamento semelhante aos das sementes ortodoxas e, como tais, são fisiologicamente afetadas pelas condições de armazenamento, incluindo as de criopreservação (PRITCHARD; POYNTER; SEATON, 1999).

Para que se caracterize o sucesso do processo de criopreservação, é necessário que se consiga a recuperação do material congelado (REED, 2008). Estudando a conservação de orquídeas nativas do cerrado, Mello (2000), observou que quando armazenadas em nitrogênio líquido ocorreu a manutenção da viabilidade das sementes mostrando que é uma técnica viável. Sementes desidratadas de *Dendrobium candidum* Wall. ex Lindl. (WANG et al., 1998) e de *Bratonia* (POPOVA; NIKISHINA, 2003), colocadas diretamente em nitrogênio líquido, apresentaram altas porcentagens de germinação. Neste trabalho, a recuperação das sementes congeladas foi bem sucedida, principalmente quando não foram utilizadas soluções crioprotetoras.

A taxa de germinação de sementes após a sua exposição ao nitrogênio líquido são dependentes das espécie, e podem ser menores ou maiores

do que no controle (NIKISHIMA et al., 2007).

O uso de soluções osmoprotetoras e de vitrificação foram testadas no intuito de avaliar se as mesmas proporcionariam boa recuperação para as sementes, mas isso não pôde ser constatado. Segundo Towill (2002), tais soluções aumentam a permeabilidade da parede celular para crioprotetores, reduzindo assim os danos a eles durante a exposição a soluções de vitrificação. O glicerol, a sacarose e trealose são crioprotetores comumente usados em protocolos de criopreservação para aumentar a viscosidade da célula e, portanto, alcançar a vitrificação de água e de inibição da formação de cristais de gelo no interior das células, beneficiando o processo de criopreservação (BENSON, 2008; FULLER, 2004).

O método da vitrificação tem sido o mais estudado pelos pesquisadores por ser rápido e de baixo custo. Em trabalho com híbridos de *Dendrobium*, Vendrame, Carvalho e Dias (2007) utilizaram o PVS2 na vitrificação de sementes antes do congelamento e obtiveram 47 a 63% de sementes viáveis após o descongelamento. Galdiano Junior et al. (2012), trabalhando com híbrido de *Dendrobium*, observaram que os tratamentos utilizando PVS2 com floroglucinol 1% e PVS2 com floroglucinol 1% mais Supercool X1000 foram os que apresentaram maior porcentagem de sementes viáveis após a criopreservação, ainda segundo os autores, as sementes que não foram tratadas com PVS2 não apresentaram germinação após o descongelamento e as que foram expostas ao PVS2 durante 60 minutos apresentaram germinação de 51%, no entanto, a germinação das sementes foi ainda aumentada para 79% com a adição de floroglucinol 1% à solução de PVS2.

Galdiano Junior et al. (2014), trabalhando com sementes do híbrido de *Dendrobium* "Dong Yai", observaram que sementes tratadas com PVS2 pelo período de 1 a 3 h apresentou maior porcentagem de germinação (entre 51 e 58%), sendo que as sementes germinadas foram posteriormente sub-cultivadas em meio de cultura P-723 e desenvolveu plantas inteiras *in vitro* após 180 dias, sem características anormais, doenças ou deficiências nutricionais.

Thammasiri (2000) estudando sementes de *Doritis pulcherrima* tratadas com PVS2, observou que congeladas em nitrogênio líquido apresentaram germinação de 62%, enquanto que as sementes colocadas diretamente no nitrogênio líquido sem a desidratação em solução de PVS2, não germinaram. Thammasiri e Soamkul (2007) obtiveram sucesso na criopreservação de *Vanda*

Vanda coerulea Griff. ex Lindl. utilizando o método da vitrificação, sendo que, cerca de 67% das sementes tratadas com PVS2 por 70 minutos foram capazes de desenvolver plântulas normais, por outro lado, sementes não tratadas com PVS2 não germinaram.

Hirano, Ishikawa e Mii (2005), utilizando o método de vitrificação em sementes imaturas de *Ponerorchis graminifolia* var. *suzukiana* (Ohwi) Soó, obtiveram 86% de sementes viáveis quando tratadas com PVS2 por 60 minutos antes da criopreservação. Hirano et al. (2005) em trabalho com sementes imaturas, com idades variando de dois a seis meses de *Bletilla striata*, pré-tratadas com PVS2 a 0°C por duas horas, observaram que sementes com quatro meses de idade apresentaram maior porcentagem de germinação (78%), do que as colocadas diretamente em nitrogênio líquido (32%).

Assim, como demonstrado pelos diferentes autores, a necessidade de pré-tratamento das sementes para o sucesso da criopreservação varia de espécie para espécie. O presente estudo demonstrou que o processo de vitrificação não foi eficiente para sementes de *Cattleya labiata* Lindl. e *Miltonia regnelli* Rchb.f., não sendo necessário o uso desta técnica, talvez porque tenha ocorrido a desnaturação de proteínas da membrana celular, estresse oxidativo e conseqüentemente a morte das células (HOEKSTRA et al., 2001, LE; MCQUEEN-MASON, 2006).

3.1.5 Conclusão

Para a criopreservação de sementes das orquídeas brasileiras *Cattleya labiata* Lindl. e *Miltonia regnelli* Rchb.f. não é necessário o uso de soluções crioprotetoras e de vitrificação.

3.1.6 Referências

- BENSON, E.E.; BREMNER, D. Oxidative stress in the frozen plant: a free radical point of view. In: FULLER, B.J.; LANE, N.; BENSON, E.E. **Life in the Frozen State**. Boca Raton: CRC Press. 2004. p.205–241.
- BENSON, E.E. Cryopreservation theory. In: Reed, B.M. (Ed.), **Plant Cryopreservation: A Practical Guide**. New York: Springer, 2008, p.15–32.
- FARIA, R.T.; ASSIS, A.M.; UNEMOTO, L.K.; CARVALHO, J.F.R.P. **Produção de Orquídeas em Laboratório**. Londrina: Mecenasa, 2012. 124p
- FRANKS, F. The properties of aqueous solutions at subzero temperatures. In: FRANKS, F. **Water: a comprehensive treatise**. New York: Plenum Press, 1982, p. 215-218
- FULLER, B.J. Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state. **Cryo-Letters**, v.25, p.375–388, 2004.
- 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.; LEMOS, E.G.M.; FARIA, R.T.; VENDRAME, W.A. Seeding development and evaluation of genetic stability of cryopreserved *Dendrobium* hybrid mature seeds. **Appl Biochem Biotechnol**, v.172, n.5, p. 2521-2529, 2014.
- HIRANO, T.; GOGO, T.; MII, M.; ISHIKAWA, K. Cryopreservation of immature seeds of *Bletilla striata* by vitrification. **Plant Cell Reports**, v.23, p.534-539, 2005.
- HIRANO, T.; ISHIKAWA, K.; MII, M. Cryopreservation of immature seeds of *Ponerorchis graminifolia* var. *suzukiana* by vitrification. **Cryo Letters**. v.26, n.3, p.139-146, 2005.
- HOEKSTRA, F.A.; GOLOVINA, E.A.; BUITINK, J. Mechanisms of plant desiccation tolerance. **Trends in Plant Science**, v.6, p.431–438, 2001.
- HOSSAIN, M.M. Asymbiotic seed germination and in vitro seedling development of *Epidendrum ibaguense* Kunth. (Orchidaceae). **African Journal of Biotechnology**, v.7, n. 20, p.3614-3619, 2008.
- JUNGHANS, T.G.; SOUZA, A.S. **Aspectos práticos da micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2009. 385p.
- 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**, v.97, p.609–620, 2006.

KARTHA, K.K. Meristem culture and germplasm preservation. In: KARTHA, K.K. **Cryopreservation of plant cells and organs**. Florida: CRC Press, 1985. p.115-134.

LAUZER, D.; ST-ARNAUD, M.; BARABÉ, D. Tetrazolium staining and in vitro germination of mature seeds of *Cypripedium acaule* (Orchidaceae). *Lindleyana*, **Palm Beach**, v.9, n.3, p.197-204, 1994.

LE, T.N.; MCQUEEN-MASON, S.J. Desiccation-tolerant plants in dry environments. **Reviews in Environmental Science Biotechnology**, v.5, p.269–279, 2006.

MELLO, C.M.C. **Conservação de sementes de orquídeas do cerrado**. 2000. 48fls. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Brasília, Brasília. 2000.

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

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.YU.; POPOV, A.S. Cryopreservation of seeds and protocorms of rare temperate orchids. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 54, p.121-127, 2007.

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

POPOVA, E.V.; NIKISHINA, T.V. The effect of seed cryopreservation on the development of protocorms by the hybrid orchid *Bratonia*. **Russian Journal of Plant Physiology**, v.50, n.5, p.672-677, 2003.

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, n.2, p.92-101, 1999.

PRITCHARD, H.W.; PRENDERGAST, F.G. Factors influencing the germination and storage of orchid pollen. In: PRITCHARD, H.W. **Modern methods in orchid conservation: the role of physiology ecology and management**. Cambridge: Cambridge University Press, 1989. p.1-16.

PRITCHARD, H.W.; SEATON, P.T. Orchid seed storage: historical perspective, current status, and future prospects for long-term conservation. **Selbyana**, v.14, p.89-104, 1993.

RALL, W.F.; REID, D.S.; POLGE, C. Analysis of slow-warming injury of mouse embryos by cryomicroscopical and physicochemical methods. **Cryobiology**. v.21, p.106-121, 1984.

REED, B.M. Cryopreservation – practical considerations. In: REED, B.M. **Plant Cryopreservation: A Practical Guide**. NewYork: Springer, 2008, p.3–14.

SAKAI, A. Cryopreservation of germplasm of woody plants. In: Bajaj, Y.P.S. (Ed.) **Biotechnology in agriculture and forestry. Cryopreservation of plant germplasm I**. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 1995, v.32, p 53-69.

- SAKAI, A.; KOBAYASHI, S.; OIYAMA, I. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb.var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. **Plant Cell Reports**. v.9, p.30-33, 1990.
- SANTOS, I.R.I. Criopreservação: potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. **Revista Brasileira Fisiologia Vegetal**, v.12, (Edição Especial): p.70-84, 2000.
- SARKAR, D.; NAIK, P.S. Phloroglucinol enhances growth and rate of axillary shoot proliferation in potato shoot tip cultures in vitro. **Plant Cell, Tissue Organ Culture**, v.60, p.139–149. 2000.
- THAMMASIRI, K. Cryopreservation of seeds of a Thai orchid (*Doritis pulcherrima* Lind.) by vitrification. **Cryo Letters**, v.21, p.237-244, 2000.
- THAMMASIRI, K.; SOAMKUL, L. Cryopreservation of *Vanda coerulea* Griff. ex Lindl. **ScienceAsia**, v.33, p.223-227, 2007.
- TOWILL, L.E. Cryopreservation of plant germplasm. In: TOWILL, L.E.; BAJAJ, Y.P.S. Cryopreservation of plant germplasm II. **Biotechnology in Agriculture and Forestry**. Berlin: Springer, v.50, p.4-21. 2002.
- VENDRAME, W.A.; FARIA, R.T; SORACE, M.; SAHYUN, S.A. Orchid Cryopreservation. **Ciência e Agrotecnologia**, v.38, n.3, p.213-229, 2014.
- 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.
- WANG, J.H.; GE, J.G.; LIU, F.; BIAN, H.W.; HUANG, C.N. Cryopreservation of seeds and protocorms of *Dendrobium candidum*. **Cryo Letters**, v.19, p.123-128, 1998.

3.2 ARTIGO B: GRAU DE UMIDADE NA CRIOPRESERVAÇÃO DE SEMENTES DE ORQUÍDEAS NATIVAS DO BRASIL

3.2.1 Resumo

O objetivo deste trabalho foi determinar o grau ideal de umidade para criopreservação das sementes das orquídeas *Cattleya labiata* Lindl. e *Miltonia regnelli* Rchb.f.. As sementes das orquídeas foram submetidas ao processo de secagem em estufa ou aumento da umidade em recipiente de vidro hermético até alcançarem os graus de umidade estabelecidos para compor os seis tratamentos (4, 6, 8, 10, 12 e 15 %) e crioconservadas a -196°C durante 24 horas e em seguida, descongeladas e analisadas. Tanto para *C. labiata* quanto para *M. regnelli*, as sementes imersas em nitrogênio líquido com 4% de grau de umidade apresentaram o maior percentual de viabilidade, atingindo 95% e 68% de sementes viáveis, respectivamente, sendo que, as sementes com 12 e 15% de grau de umidade não apresentaram sementes viáveis. Em relação à massa fresca de plântula, não houve diferença entre as espécies avaliadas.

Palavras-chave: Nitrogênio líquido. Congelamento. Sobrevivência. *Cattleya labiata* Lindl.. *Miltonia regnelli*.

DEGREE OF MOISTURE IN SEED CRYOPRESERVATION ORCHIDS NATIVE OF BRAZIL

Abstract

The objective of this study was to determine the ideal moisture content for cryopreservation of *Cattleya labiata* Lindl. and *Miltonia regnelli* Rchb.f. orchids seeds. The orchids seeds were submitted to the drying process in oven or increased humidity in airtight glass container, until they reach the moisture established to compose the six treatments (4, 6, 8, 10, 12 and 15%) and cryopreserved at -196°C for 24 hours and then thawed and analyzed. For both *Cattleya labiata* Lindl. and *Miltonia regnelli* Rchb.f., the seeds that were immersed in liquid nitrogen with 4% moisture content had the highest percentage of viability, averaging 95% and 68% of viable seeds, respectively, and, the seeds with 12 and 15% moisture content showed no viable seeds. For fresh mass seedling, there was no difference between the species evaluated.

Keywords: Liquid nitrogen. Freeze. Survival. *Cattleya labiata* Lindl.. *Miltonia regnelli* Rchb.f..

3.2.2 Introdução

Para que se tenha sucesso na conservação *ex situ* de germoplasmas de orquídeas, é necessário conhecer seu comportamento quando submetidas à redução do grau de umidade e ao armazenamento em temperaturas baixas (PRITCHARD; SEATON, 1993; KOOPOWITZ, 2001).

As sementes de orquídeas são ortodoxas, e como tais, são fisiologicamente afetadas pelas condições de armazenamento incluindo as de criopreservação (PRITCHARD; SEATON, 1993; PRITCHARD; POYNTER; SEATON, 1999; PRITCHARD; PRENDERGAST, 1989).

A criopreservação é uma técnica que apresenta potencial para um armazenamento sem limite de tempo, visto que, reduz o metabolismo a níveis tão baixos que todos os processos bioquímicos são praticamente paralisados (KARTHA, 1985). Algumas vantagens na utilização desta técnica está relacionado ao pequeno espaço ocupado por um banco de germoplasma mantido em nitrogênio líquido, simplicidade de manuseio e o baixo custo de investimento, uma vez que, não exige sistema de refrigeração e eletricidade (ALMEIDA et al., 2002).

De acordo com Vendrame et al. (2014), o ponto crítico da criopreservação é o grau de umidade das sementes que passaram por esse processo, pois, se houver pouca água nos tecidos, estes sofrerão desidratação excessiva e não sobreviverão. Por outro lado, se houver grande quantidade de água, haverá a formação de cristais de gelo no interior das células que podem ocasionar o rompimento da membrana e resultar em morte das células.

Stanwood (1985), convencionou adotar um limite máximo de umidade para o congelamento (Teor de Umidade Limite para a Criopreservação-TULC), acima do qual a viabilidade de uma amostra de sementes é reduzida durante o congelamento. Este limite crítico é, segundo o autor, normalmente uma faixa relativamente estreita de grau de umidade dentro da espécie mas pode variar entre espécies.

Em sementes de *Cattleya aurantiaca* (Bateman ex Lindl.) P.N.Don, Pritchard e Seaton (1993), observaram a redução na longevidade a 5°C quando armazenadas com grau de umidade acima e abaixo de 5%. No entanto, em trabalho com dezesseis espécies de orquídeas, Alvarez-Pardo e Ferreira (2006), obtiveram sucesso no armazenamento de sementes com grau de umidade de 6% à

temperatura de -18°C, com a manutenção da viabilidade das sementes após 24 semanas.

Diante do exposto, o objetivo do trabalho foi determinar o grau ideal de umidade para criopreservação das sementes das orquídeas *Cattleya labiata* Lindl. e *Miltonia regnelli* Rchb.f..

3.2.3 Material e Métodos

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Fitotecnia do Departamento de Agronomia da Universidade Estadual de Londrina (UEL – PR).

Cápsulas maduras de sementes das orquídeas *Cattleya labiata* Lindl. e *Miltonia regnelli* Rchb.f. Rchb. f. foram obtidas por polinização artificial de plantas cultivadas em estufa. Após a coleta as cápsulas foram dissecadas, com uso de bisturi para remoção das sementes. As sementes foram mantidas em sacos de papel a 4°C até o início dos testes.

Para início dos trabalhos, a qualidade fisiológica da semente foi avaliada mediante o teste do tetrazólio e análise de germinação e determinação do grau de umidade, obedecendo as recomendações das Regras de Análise de Sementes (BRASIL, 2009). Foi observado que no início do experimento as sementes de *Cattleya labiata* Lindl. apresentavam 9% de umidade e as sementes de *Miltonia regnelli* Rchb.f. 8%.

O grau de umidade inicial das sementes foi obtido pelo método gravimétrico com a utilização de estufa a $105 \pm 3^\circ\text{C}$, que se baseia no peso da água removida das sementes durante sua permanência na estufa por 24 horas. Para isso foi feita a média aritmética de quatro sub-amostras de 0,001 g de sementes. Os resultados foram obtidos conforme Equação 1:

$$\%U = \frac{100(P - p)}{P - t}$$

Onde:

U – grau de umidade em porcentagem de base úmida (b.u). %

P – peso inicial, peso do recipiente e sua tampa mais o peso da semente úmida;

p – peso final, peso do recipiente e sua tampa mais o peso da semente seca;

t – tara, peso do recipiente com sua tampa.

Após ser determinado o grau de umidade inicial das sementes, estas foram submetidas ao processo de secagem em estufa ou aumento da umidade em recipiente de vidro hermético, até alcançarem os graus de umidade estabelecidos para compor os seis tratamentos (4, 6, 8, 10, 12 e 15 %).

Foram utilizadas 0,004 g de sementes para cada grau de umidade. A quantidade de água extraída ou absorvida foi determinado pela Equação 2:

$$P_f = P_i \left(\frac{100 - TA_i}{100 - TA_f} \right)$$

Onde:

P_f – peso final da amostra, g;

P_i – peso inicial da amostra, g;

TA_i – grau de umidade inicial das sementes (b.u);

TA_f – grau de umidade desejada das sementes (b.u).

Para o aumento do grau de umidade, as amostras das sementes foram colocadas em pequenas cestas feitas com um anel de PVC e uma tela de silk screen de tecitura 150 fios no interior de um recipiente de vidro, herméticamente fechado, contendo 50 mL de água destilada (Figura 3.2.1). Em seguida, os recipientes foram colocados em câmara à 25°C e as amostras pesadas a cada 6 hora até que atingissem os graus de umidade desejados.

Figura 3.2.1 – Recipiente de vidro hermético utilizado no aumento do grau de umidade das sementes.



Fonte: Próprio autor

Para secagem, as amostras das sementes foram colocadas em uma estufa modelo com ventilação forçada, a temperatura de 25 a 27°C até atingirem os pesos referentes ao grau de umidade desejado, pesados em balança eletrônica com precisão de 0,0001g.

As sementes foram separadas conforme o grau de umidade, acondicionadas em criotubos e introduzidas em tanque criogênico congeladas contendo nitrogênio líquido a -196°C

Após 24 horas do congelamento, as sementes foram submetidas ao descongelamento rápido em banho de água a 40°C por 1,5 minuto e submetidas ao teste de viabilidade e à germinação.

Uma parte das sementes foi submetida ao teste de tetrazólio para avaliação da porcentagem de sementes viáveis. No teste de tetrazólio, foram previamente embebidas durante 24 horas em água destilada a 25°C, em seguida imersas em solução aquosa de 1% de sal de tetrazólio (cloreto de 2,3,5 trifenil tetrazólio) e mantidas na ausência de luz a 30°C, durante 24 horas. A contagem foi realizada ao microscópio estereoscópico Motic, considerando-se como viáveis as sementes portadoras de embriões coloridos de vermelho (LAUZER; ST-ARNAUD; BARABÉ, 1994).

Para o cálculo da porcentagem de sementes viáveis não foram consideradas sementes vazias, ou seja, que não apresentavam embrião. No início do experimento o lote das sementes de *Cattleya labiata* Lindl. apresentava 98% de viabilidade, enquanto que, das sementes de *Miltonia regnelli* Rchb.f. apresentava 47%.

Outra parte das sementes foi colocada para germinar em meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) com metade da concentração de macronutrientes. O pH foi corrigido com KOH para 5,8. O meio MS foi distribuído em frascos de vidro (40mL/frasco), estes foram fechados com tampa plástica e em seguida autoclavados a uma pressão de 105kg/cm² e temperatura de 121°C por 30 minutos (FARIA et al., 2012). Antes da semeadura, 10mg de cada lote de sementes foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio (0,5%) por 15 minutos em câmara e fluxo laminar e em seguida lavada com água destilada e autoclavada. Gotejou-se 1,0mL das soluções contendo 10mg de sementes em 10mL de água sobre o meio MS nos frascos de vidro, estes foram tampados e vedados com filme de PVC e acondicionados em sala de crescimento com temperatura de 25°C, fotoperíodo de

16 horas e luminosidade $120 \text{ umol s}^{-1}\text{m}^{-2}$ proveniente de lâmpadas fluorescentes por aproximadamente 120 dias. Para cada lote de sementes foram semeados 10 frascos.

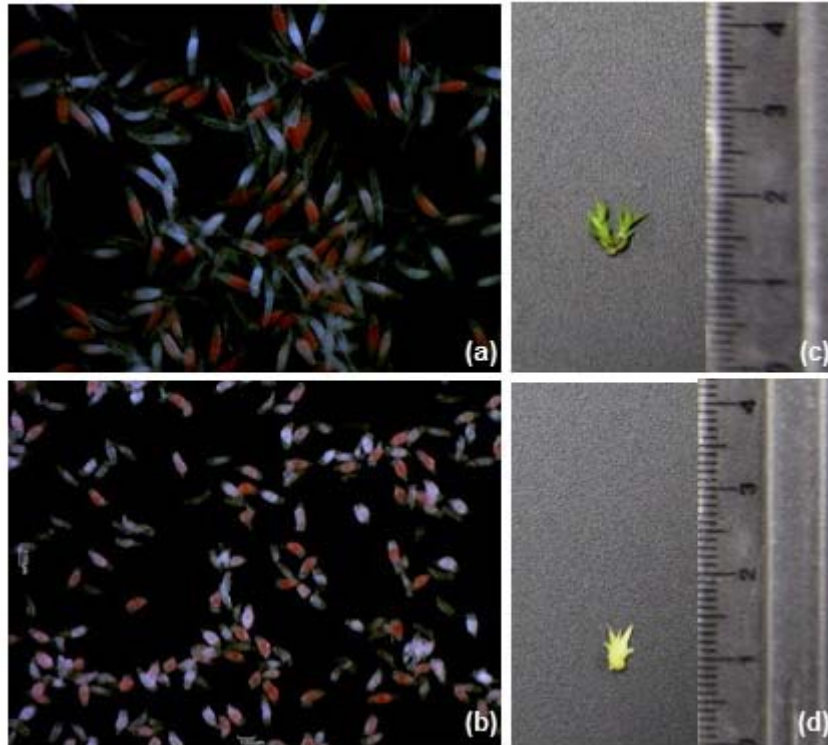
Depois de 90 dias, as sementes formando protocormos foram subcultivadas no meio MS (MURASHIGE E SKOOG, 1962), modificado com metade da concentração dos macronutrientes (1/2 MS). Após 150 dias foi determinada a percentagem de protocormos que sobreviveram ao subcultivo, massa fresca e seca de plântulas e avaliado o número de brotos formados nas plântulas de *Cattleya labiata Lindl.*

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com seis tratamentos (graus de umidade) e 10 repetições, com 10mg de sementes por tratamento. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5%.

3.2.4 Resultados e Discussão

Após o descongelamento as sementes viáveis que passaram pelo teste de tetrazólio apresentavam coloração vermelha, enquanto a outra parte das sementes foi colocada para germinar e deram origem às plântulas (Figura 3.2.2).

Figura 3.2.2 – Sementes criopreservadas em nitrogênio líquido com 4% de umidade e submetidas ao teste de tetrazólio: *Cattleya labiata* Lindl. (a) e *Miltonia regnelli* Rchb.f. (b); plântula oriunda de sementes submetidas a criopreservação em nitrogênio líquido com 4% de umidade 150 dias após o subcultivo: *Cattleya labiata* Lindl. (c) e *Miltonia regnelli* Rchb.f. (d).



Fonte: Próprio autor

Entre as sementes de *C. labiata*, as que foram imersas em nitrogênio líquido com 4% de grau de umidade apresentaram o maior percentual de viabilidade, atingindo em 95%, seguidas pelas que apresentavam 6% de grau de umidade, com viabilidade de 88% em relação a viabilidade inicial, as com 8% de grau de umidade, com 68% de viabilidade e as que possuíam 10% de grau de umidade, apresentaram 62% de viabilidade. As sementes de *M. regnelli* com 4% de grau de umidade também foram as que apresentaram maior percentual de viabilidade atingindo em média 68% de sementes viáveis, seguidas pelas que tinham 6%, 8% e 10% de grau de umidade com 53%, 19% e 13%, respectivamente. Tanto nos lotes de *C. labiata* quanto no de *M. regnelli* as sementes que possuíam 12 e 15% de grau de umidade não apresentaram sementes viáveis após o descongelamento (Tabela 3.2.1).

Em relação a porcentagem de sobrevivência após o subcultivo, não houve diferença estatística, variando de 96 a 100% de sobreviventes na *C. labiata* e

de 82 a 100% na *M. regnelli* (Tabela 3.2.1).

Tabela 3.2.1 – Porcentagem de sementes viáveis (SV) de *Cattleya labiata* Lindl. e *Miltonia regnelli* Rchb.f., pelo método do tetrazólio, submetidas a criopreservação em nitrogênio líquido com diferentes graus de umidade e porcentagem de protocormos provenientes de sementes criopreservadas que se mantiveram vivos após 150 dias do subcultivo (PV).

Grau de Umidade (%)	<i>Cattleya labiata</i> Lindl.		<i>Miltonia regnelli</i> Rchb.f.	
	SV(%)**	PV (%)	SV(%)***	PV(%)
4	95 a*	97 a*	68 a*	88 a*
6	88 b	100 a	53 b	100 a
8	69 c	96 a	19 c	82 a
10	62 d	100 a	13 c	93 a
12	0 e	-	0 d	-
15	0 e	-	0 d	-
CV%	5,49	5,57	30,05	25,07

*Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na coluna, não diferem pelo teste Tukey, a 5%.

** A viabilidade inicial das sementes de *Cattleya labiata* Lindl. era de 98%

*** A viabilidade inicial das sementes de *Miltonia regnelli* Rchb.f. era de 47%

Fonte: Próprio autor

Para a variável massa fresca de plântula, não houve diferença nas espécies avaliadas. Os valores ficaram entre 0,052 e 0,077g na *C. labiata* e entre 0,014 e 0,026 na *M. regnelli*. Nas plântulas de *C. labiata* o tratamento com sementes que possuíam 6% de grau de umidade antes do congelamento apresentaram valor maior de massa seca quando comparadas com as oriundas de sementes com 10% de grau de umidade, porém não diferiu dos demais tratamentos. Nas plântulas de *M. regnelli* o tratamento 6% de grau de umidade apresentou maior valor que o tratamento 8%, não diferindo estatisticamente dos demais (Tabela 3.2.2).

Devido a diferença na forma de desenvolvimento das espécies, foi possível avaliar o número de brotos apenas nas plântulas de *C. labiata*. Para esta variável os valores médios foram de 1,22 a 1,38 brotos por plântula, mas não apresentaram diferença (Tabela 3.2.2).

Tabela 3.2.2 – Massa fresca (g) (MFP) e massa seca (g) (MSP) de plântulas de *Cattleya labiata* Lindl. e *Miltonia regnelli* Rchb.f. e número de brotos (NB) de *Cattleya labiata* Lindl., oriundas de sementes criopreservadas em nitrogênio líquido com diferentes graus de umidade.

Tratamentos	<i>Cattleya labiata</i> Lindl.			<i>Miltonia regnelli</i> Rchb.f.	
	MFP (g)	MSP (g)	NB	MFP (g)	MSP (g)
4%	0,073 a	0,006 ab	1,37 a	0,024 a	0,0027 ab
6%	0,077 a	0,007 a	1,22 a	0,026 a	0,0034 a
8%	0,052 a	0,005 ab	1,38 a	0,014 a	0,0022 b
10%	0,052 a	0,004 b	1,29 a	0,022 a	0,0027 ab
12%	-	-	-	-	-
15%	-	-	-	-	-
CV%	34,62	30,06	38,13	46,03	31,46

*Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na coluna, não diferem pelo teste Tukey, a 5%.

Fonte: Próprio autor

A recuperação das sementes criopreservadas é de fundamental importância para comprovar a eficiência do método adotado. O teste de tetrazólio mostrou-se eficiente na avaliação da viabilidade da semente e possibilitou a obtenção de resultados de forma rápida e eficiente. Este teste também foi utilizado com sucesso para avaliação de sementes de outras orquídeas criopreservadas, como demonstrado por Hirano et al. (2005), Vendrame, Carvalho e Dias (2007), Hirano et al. (2011) e Silva (2012).

Os primeiros trabalhos sobre o armazenamento por congelamento de sementes de orquídea foram feitos utilizando temperaturas que variavam de -10°C a -40°C e demonstraram que era possível obter sementes viáveis após o descongelamento, porém, por serem desidratadas previamente e conforme aumentava o tempo de armazenamento havia a redução e até a perda total da viabilidade destas sementes (KOOPOWITZ; WARD, 1984; BOWLING; THOMPSON, 1972). Pritchard (1986), observou que quando armazenadas a -10°C algumas espécies perdiam a viabilidade de todas as sementes em oito anos.

Pritchard e Seaton (1993) observaram que as características de armazenamento de sementes de orquídeas são classificadas como "ortodoxas" no sentido em que a longevidade das sementes é aumentada pela redução do grau de umidade (de cerca de 20%, base úmida, a 5%) e as temperaturas de armazenamento decrescentes (a partir de 62°C a 0°C).

Estrelles e Gonzales-Benito (2015), trabalhando com sete espécies de *Brassicaceae* em diferentes temperaturas e graus de umidade, concluíram que

existe grande variação para as condições ideais de armazenamento entre as espécies e que para a maioria delas é problemático o armazenamento das sementes com alto grau de umidade.

Os métodos tradicionais de armazenamento de sementes de orquídeas seriam problemáticos se utilizados, por exemplo, em um banco de sementes. Porém, em temperaturas ultra-baixas, os resultados são mais promissores, tanto em orquídeas, como em outras espécies. Em *Pistacia vera* L., obteve-se um máximo de 90% de germinação após 8 horas de secagem em sílica gel (o que correspondeu a 11,7% de grau de umidade) e imersão direta em nitrogênio líquido. Em *Pistacia terebinthus* e *P. lentiscus*, quando reduziu-se o grau de umidade para cerca de 20%, obteve-se a germinação de 16% e 47% das sementes, respectivamente (OZDEN-TOKATLI et al., 2007).

Estudos mostram que o grau ideal de umidade das sementes para congelamento em temperaturas ultra-baixas pode variar conforme os gêneros e espécies. Thammasiri (2000), criopreservou sementes de *Doritis pulcherrima* com 31% de umidade em nitrogênio líquido, sem sucesso, pois a porcentagem de germinação foi zero após o descongelamento, assim como Carvalho (2006), que trabalhando com três cultivares do gênero *Dendrobium* observou que sementes com 9% de umidade colocadas diretamente em nitrogênio líquido (-196°C) não germinaram após o descongelamento. Enquanto que, Wang et al. (1998), obtiveram 88% de viabilidade após a criopreservação em nitrogênio líquido de sementes de *Dendrobium candidum*, com 12 a 19% de grau de umidade.

Pode-se observar que na maioria dos casos, quando o grau de umidade é menor, na faixa entre 4 e 6%, a possibilidade de obter sementes viáveis é maior. Sakai et al. (1991) afirmam que uma das etapas mais importantes na criopreservação é o processo de desidratação, pois visa evitar danos físicos, pela formação de cristais de gelo, às células durante o período de congelamento.

3.2.5 Conclusão

O grau de umidade para obtenção de maior frequência de sementes viáveis de *Cattleya labiata* Lindl. e *Miltonia regnelli* Rchb.f. foi de 4%.

3.2.6 Referências

- ALMEIDA, F.A.C.; MORAIS, A.M.; CARVALHO, J.M.F.C.; GOUVEIA, J.P.G. Crioconservação de sementes de mamona das variedades nordestina e pernambucana. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.6, n. 2, p.295-302, 2002.
- ALVAREZ-PARDO, V.; FERREIRA, A.G. Armazenamento de Sementes de Orquídeas. **Revista Brasileira de Sementes**, v.28, n.1, p.92-98, 2006.
- 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. p.399.
- CARVALHO, V. S. **Criopreservação de sementes e pólen de orquídeas**. 2006. 82f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 2006.
- ESTRELLES, S.M.E; GONZALEZ-BENITO, M.E. Effect of water content and temperature on seed longevity of seven *Brassicaceae* species after 5 year of storage. **Plant Biology**. v.17, p.153-162, 2015.
- FARIA, R.T.; ASSIS, A.M.; UNEMOTO, L.K.; CARVALHO, J.F.R.P. **Produção de Orquídeas em Laboratório**. Londrina: Mecenias, 2012. 124p.
- HIRANO, T.; YUKAWA, T.; MIYOSHI, K.; MII, M. Wide applicability of cryopreservation with vitrification method of seeds of some *Cymbidium* species. **Plant Biotechnology**, v.28, p.99-102, 2011.
- HIRANO, T.; GOGO, T.; MII, M.; ISHIKAWA, K. Cryopreservation of immature seeds of *Bletilla striata* by vitrification. **Plant Cell Reports**, v.23, p.534-539, 2005.
- KARTHA, K.K. Meristem culture and germplasm preservation. In: KARTHA, K.K. **Cryopreservation of plant cells and organs**. Florida: CRC Press, 1985. p.115-134.
- KOOPOWITZ, H. **Orchids and their conservation**. Portland, Oregon: Timber Press, 2001. 177p.
- KOOPOWITZ, H.; WARD, R. A technological solution for the practical conservation of orchid species. **Orchid Advocate**, v.10, p.43-45, 1984.
- LAUZER, D.; ST-ARNAUD, M.; BARABÉ, D. Tetrazolium staining and in vitro germination of mature seeds of *Cypripedium acaule* (Orchidaceae) Lindleyana. **Palm Beach**, v.9, n.3, p.197-204, 1994.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.

OZDEN-TOKATLI, Y.; OZUDOGRU, E.A.; GUMUSEL, F.; LAMBARDI, M. Cryopreservation of *Pistacia spp.* Seeds by dehydration and one-step freezing. **Cryo Letters**. v.28, n.2, p.83-94, 2007.

PRITCHARD, H.W. Orchid seed storage at the Royal Botanic Gardens, Kew, England. 2. Physiology Unit, Wakehurst Place. **Orchid Research Newsletter**, v.7, p.18, 1986.

PRITCHARD, H.W.; POYNTER, A.L.C.; SEATON, P.T. Interespecific variation in orchid seed longevity in relation to ultra-dry storage and cryopreservation. **Lindleyana**, v.14, n.2, p.92-101, 1999.

PRITCHARD, H.W.; PRENDERGAST, F.G. Factors influencing the germination and storage of orchid pollen. In: PRITCHARD, H.W. **Modern methods in orchid conservation: the role of physiology ecology and management**. Cambridge: Cambridge University Press, 1989. p.1-16.

PRITCHARD, H.W.; SEATON, P.T. Orchid seed storage: historical perspective, current status, and future prospects for long-term conservation. **Selbyana**, v.14, p.89-104, 1993.

SAKAI, A.; KOBAYASHI, S.; OIYAMA, I. Survival by vitrification of nucelar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb.var. *brasiliensis* Tanaka) cooled to -196°C. **Journal Plant Physiology**, v.137, p.465-470, 1991.

SILVA, D.M. **Micropropagação e Citogenética de *Cyrtopodium saintlegerianum* Rchb. f. (Orchidaceae: Cyrtopodiinae)**. 2012. 95fls. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2012

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

THAMMASIRI, K. Cryopreservation of seeds of a Thai orchid (*Doritis pulcherrima* Lind.) by vitrification. **Cryo Letters**, v.21, p.237-244, 2000.

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

WANG, J.H.; GE, J.G.; LIU, F.; BIAN, H.W.; HUANG, C.N. Cryopreservation of seeds and protocorms of *Dendrobium candidum*. **Cryo Letters**, v.19, p.123-128, 1998.

4 CONCLUSÕES GERAIS

Para a criopreservação de sementes das orquídeas brasileiras *Cattleya labiata* Lindl. e *Miltonia regnelli* Rchb.f. não é necessário o uso de soluções crioprotetoras e de vitrificação.

O grau de umidade para obtenção de maior frequência de sementes viáveis de *Cattleya labiata* Lindl. e *Miltonia regnelli* Rchb.f. foi de 4%.