



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS

MARIANA IZABEL SCHVAMBACH

**CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA DE SEMENTES SUBMETIDAS A
DIFERENTES CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO E DE PLÂNTULAS DE
Cattleya intermedia GRAHAM EX HOOK. (ORCHIDACEAE)**

FLORIANÓPOLIS- SC

2020

Mariana Izabel Schvambach

**CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA DE SEMENTES SUBMETIDAS A
DIFERENTES CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO E DE PLÂNTULAS DE
Cattleya intermedia GRAHAM EX HOOK. (ORCHIDACEAE)**

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

FLORIANÓPOLIS- SC

2020

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

Schvambach, Mariana Izabel
CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA DE SEMENTES SUBMETIDAS A
DIFERENTES CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO E DE PLÂNTULAS DE
Cattleya intermedia GRAHAM EX HOOK. (ORCHIDACEAE) /
Mariana Izabel Schvambach ; orientadora, Rosete Pescador,
2020.
100 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós
Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Florianópolis,
2020.

Inclui referências.

1. Recursos Genéticos Vegetais. 2. Orchidaceae. 3.
Conservação ex situ. 4. Viabilidade de sementes. 5.
Morfoanatomia. I. Pescador, Rosete . II. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Recursos Genéticos Vegetais. III. Título.

Mariana Izabel Schvambach

**CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA DE SEMENTES SUBMETIDAS A
DIFERENTES CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO E DE PLÂNTULAS DE
Cattleya intermedia GRAHAM EX HOOK. (ORCHIDACEAE)**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof^ª. Dr^ª. Karin Esemann de Quadros
Universidade Univille- Joinville

Prof. Dr. Paulo Cesar Poeta Fermino Junior
Universidade Federal de Santa Catarina- CCR\Curitibanos

Prof. Dr. Valdir Marcos Stefenon
Universidade Federal de Santa Catarina- CCA\Florianópolis

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Ciências no Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais.

Prof. Dr. Claudio Roberto Fonseca Sousa Soares
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais

Prof^ª. Dr^ª. Rosete Pescador
Orientadora

Florianópolis, 05 de novembro de 2020.

Deus,
por tanto a agradecer e tão pouco pedir

Ofereço

Aos meus amáveis pais Nilvo Schwambach e Lourdete Izabel Schmitz Schwambach e minha irmã Maiara Aline Schwambach por todo apoio, confiança, amor e incentivo.

Com amor

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida e por me conceder saúde e força para a realização de mais essa etapa de minha vida acadêmica.

Aos meus pais, Nilvo e Lourdete, e à minha irmã Maiara, pelo amor incondicional, paciência, apoio e por sempre acreditarem em mim.

À minha grande orientadora Rosete Pescador pela oportunidade, dedicação, confiança e amizade, sem você nada disso seria possível.

À professora Cristina Magalhães Ribas pelo seu atencioso olhar e importantes sugestões para a construção deste trabalho.

À Universidade Federal de Santa Catarina e ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais pela formação acadêmica e infraestrutura disponibilizada.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro e pela bolsa que possibilitou a realização desta pesquisa.

À secretária Bernadete Ribas por todo o esclarecimento de dúvidas e ajuda com os documentos.

Aos colegas de laboratório do Núcleo de Pesquisas em Biotecnologia e Desenvolvimento Vegetal: Priscila Fernandes de Souza, Rafaela Gadret Rizzolo, Nadhine Nostrani Cabral, Bruna Vargas Andriolli, Elisandra Maria Pradella, Giuliano Rigo, Sebastian Montoya, Beatriz Hernandes, Suelen Guterres e Helder Ricardo por toda a ajuda e conselhos científicos.

Ao Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal (LFDGV), ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) e ao Laboratório Multiusuários de Estudos em Biologia (LAMEB) pelo espaço disponibilizado e conhecimentos adquiridos.

À querida bióloga Daniela Linhares do Orquidário Carlos Gomes pelas sementes cedidas para a realização desta pesquisa.

Aos membros da banca pela gentileza em aceitar o convite para participarem da defesa e pelas sugestões para melhorias do presente trabalho.

A dissertação de mestrado não é resultado do trabalho de uma só pessoa. Por isto, agradeço a todos que, de alguma maneira, acompanharam a minha jornada e que contribuíram para a concretização desse trabalho.

À todos o meu: **Muito obrigada!**

“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar
uma alma humana, seja apenas outra alma humana.”

Carl Gustav Jung

RESUMO

Estudos que envolvem o armazenamento de sementes são considerados escassos e necessários para estabelecer um protocolo eficiente de conservação, em especial para as espécies que se encontram sob algum tipo de ameaça, como as orquídeas. Diante do exposto, os objetivos desse trabalho foram realizar a caracterização morfofisiológica e anatômica de sementes de *Cattleya intermedia* Graham ex Hook. (Orchidaceae) submetidas à diferentes temperaturas e períodos de armazenamento. Os tratamentos foram constituídos pelas temperaturas: 25 ($\pm 2^\circ\text{C}$) (ambiente), -20°C (freezer), -80°C (ultra freezer) e -196°C (criopreservação) e pelos períodos de armazenamento: dois, quatro e seis meses. A qualidade das sementes foi avaliada por testes de tetrazólio e de germinação. A qualidade das plântulas oriundas das sementes submetidas aos diferentes tratamentos de armazenamento foi avaliada por parâmetros morfológicos do desenvolvimento, identificação dos diferentes estádios de desenvolvimento e alterações morfológicas. As análises anatômicas e histoquímicas das sementes foram realizadas com colorações de azul de toluidina (ATO), azul brilhante de coomassie (CBB), Sudan IV e ácido periódico de Schiff (PAS) e observações em microscopia eletrônica de varredura e microscopia de luz. Observou-se que a temperatura de -80°C (ultra freezer) é viável e eficaz tanto para conservação de germoplasma quanto para a retomada de desenvolvimento e germinação das sementes. Foram descritos estádios de desenvolvimento desde a semente até a formação de plântulas normais e observadas alterações morfológicas nas plântulas em decorrência dos diferentes tipos de armazenamento, como: ausência de raiz adventícia e desenvolvimento reduzido, folhas atrofiadas e/ou necrosadas e/ou deformadas, região basal necrosada, raiz adventícia atrofiada e plântula totalmente oxidada. Foi observado dano por desidratação decorrente do armazenamento, responsável pela perda da viabilidade das sementes. Também foram observadas alterações na estrutura interna destas, como a degeneração, causando redução nos principais compostos de reservas. Com os resultados obtidos pode-se concluir que a temperatura de -80°C (ultra freezer) durante os períodos de dois e quatro meses mostrou-se eficiente na conservação de parâmetros morfofisiológicos das sementes de *C. intermedia*, sendo este o primeiro trabalho a relatar a qualidade de sementes e mudas de orquídea dessa espécie oriundas de diferentes condições de armazenamento, além das alterações decorrentes dos diferentes tratamentos. Este trabalho fornece uma base para que mais estudos que envolvam a conservação *ex situ* de diferentes espécies sejam realizados.

Palavras-chave: Orchidaceae. Conservação *ex situ*. Cultivo *in vitro*. Viabilidade de sementes. Morfoanatomia.

ABSTRACT

Studies involving the storage of seeds are considered scarce and necessary to establish an efficient conservation protocol, especially for species that are under some type of threat, such as orchids. In view of the above, the objectives of this work were to carry out the morphophysiological and anatomical characterization of *Cattleya intermedia* seeds Graham ex Hook. (Orchidaceae) submitted to different temperatures and storage periods. The treatments consisted of temperatures: 25 ($\pm 2^\circ\text{C}$) (room), -20°C (freezer), -80°C (ultra freezer) and -196°C (cryopreservation) and storage periods: two, four and six months. Seed quality was assessed by tetrazolium and germination tests. The quality of seedlings from seeds submitted to different storage treatments was evaluated by developmental morphological parameters, identification of different developmental stages and morphological changes. The anatomical and histochemical analyzes of the seeds were carried out with colorings of toluidine blue (TB-O), brilliant coomassie blue (CBB), Sudan IV and periodic acid-Schiff (PAS) and observations in scanning electron microscopy and light microscopy. It was observed that the temperature of -80°C (ultra freezer) is viable and effective both for the conservation of germplasm and for the resumption of development and germination of seeds. Developmental stages from seed to normal seedling formation have been described and morphological changes in seedlings have been observed as a result of different types of storage, such as: absence of adventitious root and reduced development, atrophied and/or necrotic and/ or deformed leaves, region necrotic basal, atrophied adventitious root and oxidized seedling. Damage by dehydration resulting from storage was observed, responsible for the loss of seed viability. Changes in their internal structure were also observed, such as degeneration, causing a reduction in the main reserve compounds. With the results obtained it can be concluded that the temperature of -80°C (ultra freezer) during the periods of two and four months was efficient in the conservation of morphophysiological parameters of the seeds of *C. intermedia*, this being the first work to report the quality of orchid seeds and seedlings of this species from different storage conditions, in addition to changes resulting from different treatments. This work provides a basis for further studies involving ex situ conservation of different species to be carried out.

Keywords: Orchidaceae. *Ex situ* conservation. *In vitro* culture. Seed viability. Morphoanatomy.

LISTA DE FIGURAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Figura 1 Flor da espécie *Cattleya intermedia* Graham ex Hook.....23

CAPÍTULO 1: Desenvolvimento pós seminal e qualidade de sementes de orquídea *Cattleya intermedia* Graham ex Hook. submetidas a diferentes condições de armazenamento

Figura 1 Desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya intermedia*, até 180 dias após a semeadura.....50

Figura 2 Equações de regressão da viabilidade das sementes (%) de *Cattleya intermedia* submetidas a diferentes temperaturas (°C) e períodos de armazenamento (meses).....52

Figura 3 Equações de regressão da germinação (%) de sementes de *Cattleya intermedia* submetidas a diferentes temperaturas (°C) e períodos de armazenamento (meses).....54

Figura 4 Morfologia do desenvolvimento de plântulas de *Cattleya intermedia*, provenientes de sementes armazenadas sob diferentes temperaturas durante dois meses.....56

CAPÍTULO 2- Caracterização anatômica e histoquímica de sementes de *Cattleya intermedia* Graham ex Hook. submetidas a diferentes condições de armazenamento

Figura 1 Estruturas, microscopia eletrônica de varredura e microscopia de luz de *Cattleya intermedia*.....77

Figura 2 Microscopia eletrônica de varredura de sementes de *Cattleya intermedia* submetidas a diferentes temperaturas e períodos de armazenamento.....79

Figura 3 Microscopia de luz e análise histoquímica com ATO de sementes de *Cattleya intermedia* submetidas a diferentes temperaturas e períodos de armazenamento.....81

Figura 4 Microscopia de luz e análise histoquímica com CBB de sementes de *Cattleya intermedia* submetidas a diferentes temperaturas e períodos de armazenamento.....83

Figura 5 Microscopia de luz e análise histoquímica com Sudan IV de sementes de *Cattleya intermedia* submetidas a diferentes temperaturas e períodos de armazenamento.....85

Figura 6 Microscopia de luz e análise histoquímica com PAS de sementes de *Cattleya intermedia* submetidas a diferentes temperaturas e períodos de armazenamento.....87

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1- Desenvolvimento pós seminal e qualidade de sementes de orquídea *Cattleya intermedia* Graham ex Hook. submetidas a diferentes condições de armazenamento

Tabela 1. Tratamentos de armazenamento de sementes de *Cattleya intermedia* sob diferentes temperaturas e períodos.....45

Tabela 2. Estádios de desenvolvimento, dias após a semeadura (DAS) e características das estruturas de sementes e plântulas de *Cattleya intermedia*, durante a germinação *in vitro*, à temperatura ambiente de 25°C (adaptado de Arditti 1967 e Stewart e Zettler 2002)49

Tabela 3. Percentual de viabilidade de sementes de *Cattleya intermedia* submetidas ao teste de tetrazólio após diferentes temperaturas e períodos de armazenamento.....51

Tabela 4. Percentual de germinação de sementes de *Cattleya intermedia* submetidas a diferentes temperaturas e períodos de armazenamento.....53

Tabela 5. Porcentagem de sobrevivência (PS), altura das plântulas (AP), comprimento da maior raiz (CR), número de folhas (NF), número de raízes (NR) e a massa fresca das plântulas (MF) provenientes de sementes de *Cattleya intermedia* submetidas à diferentes temperaturas e períodos de armazenamento com retomada do desenvolvimento em cultivo *in vitro* após 60 dias.....55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C- grau Celsius

%- porcentagem

g.L⁻¹- grama por litro

µg- microgramas

µg.g⁻¹- micro grama por grama

µl- microlitros

µm – micrômetro

µmol.m⁻².s⁻¹- conversão de PPFD para Lux

ANOVA- análise de variância

AP- altura das plântulas

ATO- azul de toluidina

CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CBB- azul brilhante de coomassie

CCA- Centro de Ciências Agrárias

C. *intermedia*- *Cattleya intermedia* Graham ex Hook

CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CR- comprimento da maior raiz

DIC- delineamento inteiramente casualizado

ESPs- Estruturas semelhantes a protocormos

FAPESC- Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação de Santa Catarina

HMDS- Hexametildisilazano

GN- número de sementes que germinaram

LAMEB- Laboratório Multiusuários de Estudos em Biologia

LCME- Laboratório Central de Microscopia Eletrônica

Leica Historesin- Hidroxietilmetacrilato

LFDGV- Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal

M- N° de mols do soluto / N° de litros de solução

MF- massa fresca das plântulas

min- minutos

mg- miligrama

mL- mililitro

mm- milímetros

MS- Meio de Cultura Murashige & Skoog (1962).

NF- número de folhas

nm- nanômetro

NPBV- Laboratório de Núcleo de Pesquisas em Biotecnologia e Desenvolvimento Vegetal

NR- número de raízes

Nº SEC- número de sementes com embriões clorofilados

Nº TS- número total de sementes

PAS- ácido periódico de Shiff

pH- potencial hidrogeniônico (Escala de Íons em Solução).

PS- porcentagem de sobrevivência

Q-Boa®- Solução comercial de hipoclorito de sódio

SC- Santa Catarina

Spurr- Resina Spurr

UFSC- Universidade Federal de Santa Catarina

v\v- volume por volume

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO, JUSTIFICATIVA E ANTECEDENTES.....	17
2 OBJETIVOS	20
2.1 OBJETIVO GERAL	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
3.1 Família Orchidaceae	21
3.2 Gênero <i>Cattleya</i>	22
3.3 Espécie <i>Cattleya intermedia</i> Graham ex Hook.	22
3.4 Sementes de orquídeas.....	23
3.5 Conservação de sementes de orquídeas	24
3.6 Armazenamento de sementes de orquídeas	25
3.7 Criopreservação	26
3.8 Viabilidade, vigor e germinação de sementes	27
3.9 Testes para avaliação da qualidade das sementes.....	28
3.10 Caracterização anatômica e química de sementes	29
4 REFERÊNCIAS	30
5 CAPÍTULO 1- Desenvolvimento pós seminal e qualidade de sementes de orquídea <i>Cattleya intermedia</i> Graham ex Hook. submetidas a diferentes condições de armazenamento.....	41
5.1 Introdução	42
5.2 Material e Métodos	44
5.2.1 Material vegetal	44
5.2.2 Delineamento experimental para o armazenamento de sementes	45
5.2.3 Condições para o armazenamento e recuperação pós armazenamento das sementes	45
5.2.4 Avaliações quantitativas	46
5.2.4.1 Teste de tetrazólio.....	46

5.2.4.2 Teste de germinação <i>in vitro</i>	46
5.2.5 Avaliação de crescimento e desenvolvimento pós seminal <i>in vitro</i>	47
5.2.6 Análise estatística	48
5.3 Resultados.....	48
5.3.1 Caracterização do desenvolvimento pós seminal	48
5.3.2 Teste de tetrazólio.....	51
5.3.3 Teste de germinação	52
5.3.4 Análise do crescimento e desenvolvimento de plântulas	54
5.3.5 Alterações morfológicas oriundas do armazenamento	55
5.4 Discussão	57
5.4.1 Estádios de desenvolvimento de <i>Cattleya intermedia</i>	57
5.4.2 Viabilidade e capacidade germinativa de sementes armazenadas.....	58
5.4.3 Morfologia do desenvolvimento das plântulas oriundas de sementes armazenadas	61
5.4.4 Alterações morfológicas em plântulas oriundas de sementes armazenadas.....	62
5.5 Conclusões.....	63
5.6 Agradecimentos	63
5.7 Referências	64
6 CAPÍTULO 2- Caracterização anatômica e histoquímica de sementes de <i>Cattleya intermedia</i> Graham ex Hook. submetidas a diferentes condições de armazenamento.....	70
6.1 Introdução	71
6.2 Material e Métodos	73
6.2.1 Material vegetal e local do experimento.....	73
6.2.2 Delineamento experimental e condições de armazenamento das sementes	74
6.2.3 Análise sob microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	75
6.2.4 Análise sob microscopia de luz (ML).....	75
6.3 Resultados.....	76

6.3.1 Caracterização de sementes não submetidas ao armazenamento	76
6.3.2 Análise das sementes sob microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	77
6.3.3 Análise histoquímica com azul de toluidina (ATO)	80
6.3.4 Análise histoquímica com azul brilhante de coomassie (CBB).....	82
6.3.5 Análise histoquímica com sudan IV	84
6.3.6 Análise histoquímica com ácido periódico de Schiff (PAS)	86
6.4 Discussão	88
6.4.1 Caracterização de sementes não submetidas ao armazenamento	88
6.4.2 Desidratação das sementes durante o armazenamento	89
6.4.3 Alterações nas reservas lipídicas das sementes.....	88
6.4.4 Alterações nas reservas proteicas das sementes.....	89
6.4.5 Alterações em carboidratos presentes nas sementes.....	90
6.4.6 Modificações em compostos formadores do embrião e do suspensor e seus efeitos sobre a capacidade de originar novas plântulas após o armazenamento	91
6.5 Conclusões	93
6.6 Agradecimentos	94
6.7 Referências	94
7 CONCLUSÕES E PERPECTIVAS	100

1 INTRODUÇÃO, JUSTIFICATIVA E ANTECEDENTES

A família Orchidaceae é um dos grupos morfológicamente e ecologicamente mais diversos, entre as plantas com flores, nativas das regiões tropicais e subtropicais do mundo (GIVNISH et al., 2015). Engloba cerca de 2.809 espécies pertencentes a 252 gêneros, sendo 121 espécies pertencentes ao gênero *Cattleya* Lindl. Muitas das espécies dessa família estão na lista de risco de extinção, com declínio de suas populações naturais, em função da destruição de seus habitats e as coletas predatórias (FLORA DO BRASIL, 2020; COLOMBO et al., 2004; BRUSTULIN & SCHMITT., 2008).

As orquídeas são plantas de importância econômica e ecológica com potencial ornamental devido à beleza, exuberância e variedade de cores de suas flores (SHEEHAN, 1992; ALTAFIN et al., 2004). Por conta de seu elevado valor ornamental e para evitar a perda desse valioso recurso genético é necessário a realização de ações efetivas (PRITCHARD et al., 1999), como a conservação de sementes viáveis e a produção vegetativa de mudas. Estas são alternativas indispensáveis para a preservação das espécies que pertencem a essa família (MELLO, 2000).

Programas de conservação de germoplasma vegetal envolvem diferentes estratégias incluindo estudos de conservação *ex situ*. Segundo Iriondo (2001), na conservação *ex situ* de espécies ameaçadas, podem ser consideradas estratégias de preservação do germoplasma o desenvolvimento de métodos que possibilitem sua propagação. Assim, técnicas de armazenamento e de cultura de tecidos, tem se apresentado como estratégias de conservação e propagação em larga escala para as espécies de orquídeas (GUERRA & DAL VESCO, 2010).

Kerbauy (1998) explica que a cultura de tecidos vegetais tem fundamento no princípio da totipotência das células, pelo qual uma única célula demonstra a capacidade de se diferenciar e regenerar uma planta completa. Este complexo processo morfogenético ocorre com um importante papel dos fatores extrínsecos e intrínsecos nos tecidos (DUCLERCQ et al, 2011). Com isso, a técnica da cultura de tecidos é um sistema indispensável para investigar processos que envolvem parâmetros morfológicos, bioquímicos e moleculares relacionados com o desenvolvimento inicial das plantas (MILTROVIC et al., 2012).

Outra estratégia de conservação é a forma e o sucesso do armazenamento das sementes, tendo como premissa que diferentes espécies exigem condições únicas para a sua

conservação (HONG et al., 1996), bem como, o tempo e as condições de armazenamento influenciam na sua sobrevivência, longevidade e vigor (LEMOS FILHO & DUARTE, 2001).

Uma das possibilidades para aumentar o tempo de armazenamento e a manutenção da viabilidade das sementes é submetê-las a baixa temperatura para a redução das taxas metabólicas (BONNER & KARRFALT, 2008). O armazenamento das sementes pode ser realizado através de condições de câmara fria e seca, resfriamento em refrigerador e o congelamento em freezer (ENGELS et al., 2002).

A criopreservação, também é considerada uma forma de preservar e conservar as sementes ou qualquer outro tipo de germoplasma (TOWILL, 2002). Nesse método o material biológico é preservado a baixas temperaturas entre -150 a -196° C. O resultado é a paralisação dos processos metabólicos e o estado latente, que possibilita a preservação do material vegetal por um longo tempo (MEDEIROS & CAVALLAR., 1992).

Estudos que abrangem o armazenamento de sementes, em especial de espécies nativas ou que apresentem algum interesse econômico, vêm sendo objeto de estudo para muitos pesquisadores, como principal objetivo conservar ao máximo a viabilidade e o vigor das sementes armazenadas (CARVALHO & NAKAGAMA, 2012; GALLI et al., 2012; GOLDFARB et al., 2010).

Segundo Koopowitz (2001), as sementes de orquídeas são diminutas, apresentando embrião rudimentar e apenas algumas células de armazenamento, justificando os poucos estudos relacionados à sua fisiologia e seus aspectos anatômicos. Não se tem na literatura, para todas as espécies de orquídeas, procedimentos adequados de armazenamento, principalmente no que diz respeito aos fatores como temperatura e umidade. Assim, estudos relativos ao estabelecimento de protocolos de armazenamento são necessários para a manutenção da qualidade de sementes de espécies da família Orchidaceae (SEATON & PRICHARD, 2011).

A qualidade das sementes está pautada nas características genéticas, fisiológicas e sanitárias e, para a avaliação da qualidade fisiológica das sementes, é necessária a utilização de testes, como os padronizados, para garantir maior grau de segurança através da comparação dos resultados (TOLEDO & MARCOS FILHO, 1977; MARCOS FILHO et al., 1987). Geralmente são utilizados os testes de germinação e de vigor para identificar diferenças na qualidade fisiológica das sementes (BRASIL, 2009; VIEIRA & CARVALHO, 1994). Os testes de vigor fornecem informações adicionais ao teste de germinação e avaliam o potencial fisiológico das sementes (DUTRA & MEDEIROS FILHO, 2008).

A composição química das sementes é um outro fator a ser avaliado, dada a importância das reservas no seu vigor e germinação. Estudos sobre a anatomia e a histoquímica também são importantes, pois é possível identificar, localizar e compartimentalizar os compostos de reservas em sementes (MENDES, 1995; NAKAGAWA et al., 1990, PREGO et al., 1998; SERRATO VALENTI, 1998, OTEGUI et al., 1998; CORTE et al., 2008).

Considerando-se que a família Orchidaceae abrange mais de 27.801 espécies distribuídas ao longo do planeta (THE PLANT LIST, 2020) e que estas possuem uma relevante importância econômica e ecológica, pesquisas voltadas para espécies dessa família são indispensáveis e já vêm sendo realizadas pelo grupo Núcleo de Pesquisas em Biotecnologia e Desenvolvimento Vegetal (NPBV-UFSC), com foco principal no gênero *Cattleya*. Liz (2013) abordou aspectos relacionados a morfo histodiferenciação do desenvolvimento de protocormos e Estruturas semelhantes a protocormos (ESPs) de espécies do gênero *Cattleya*. Almeida (2014) verificou os amidos, proteínas, poliaminas e a metilação do DNA em Estruturas semelhantes a protocormos (ESPs) de *C. tigrina*. No trabalho realizado por De Conti (2016) foram elucidados aspectos relacionados a caracterização fisiológica e bioquímica do padrão de desenvolvimento de Estruturas semelhantes a protocormos (ESPs) de *C. tigrina*. Liz (2017) ainda abordou aspectos relacionados a citometria de fluxo, análises estruturais e bioquímicas de Estruturas semelhantes a protocormos (ESPs) de *C. tigrina* e Andriolli (2019) trouxe aspectos relacionados a criopreservação de sementes e a caracterização morfo histológica da germinação *in vitro* de *C. crispa*.

Em relação a *C. intermedia*, poucos trabalhos foram publicados sobre essa espécie, principalmente em relação a conservação *ex situ* de sementes. Diante disso, os objetivos desse trabalho foram realizar a caracterização morfofisiológica e anatômica de sementes de *Cattleya intermedia* Graham ex Hook. (Orchidaceae) submetidas à diferentes temperaturas e períodos de armazenamento. A dissertação está organizada em dois capítulos, antecidos por uma revisão bibliográfica. O primeiro capítulo abrange o estudo relacionado a qualidade das sementes e plântulas de *C. intermedia* Graham ex Hook. submetidas à diferentes condições de armazenamento, enquanto o segundo capítulo aborda aspectos relacionados à caracterização anatômica e histoquímica dessas sementes, além de verificar a ocorrência de possíveis alterações causadas pelas diferentes temperaturas e períodos de armazenamento aos quais essas sementes foram submetidas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Os objetivos desse trabalho foram realizar a caracterização morfofisiológica e anatômica de sementes de *Cattleya intermedia* Graham ex Hook. (Orchidaceae) submetidas à diferentes temperaturas e períodos de armazenamento.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Como objetivos específicos buscou-se:

- Caracterizar o desenvolvimento pós seminal inicial da espécie;
- Avaliar o efeito das diferentes condições de armazenamento (temperatura e período) sobre a qualidade das sementes e das plântulas geradas a partir destas sementes por cultivo *in vitro*;
- Registrar através da caracterização morfoanatômica e histoquímica a ocorrência de possíveis alterações nas sementes decorrentes das diferentes temperaturas e períodos de armazenamento.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Família Orchidaceae

Plantas da família Orchidaceae originaram-se na Malásia, há milhões de anos, quando a maioria das famílias das angiospermas tornava-se diferenciadas (GARAY, 1972). A família está subdividida em cinco subfamílias: Apostasioideae, Cyripedioideae, Epidendroideae, Orchidoideae e Vaniloideae (DRESSLER, 1993; FARIA et al., 2010). A qual a subfamília Epidendroideae apresenta o maior número de espécie e gêneros, com destaque para o gênero *Cattleya* (BARROS, 1990).

Espécies dessa família encontram-se distribuídas em praticamente todos os continentes, exceto nas regiões desérticas e nos polos (CHASE, 2005). Apresentam-se herbáceas perenes e possuem grande capacidade de sobreviver em diferentes ambientes o que resultou em plantas com diferentes formas de vida, sendo estas: epífitas, terrestres, saprófitas e rupícolas (DRESSLER, 1993; MILLER & WARREN, 1996).

Em ambientes subtropicais e tropicais, essa família possui um maior número de representantes, sendo que no Brasil dispõe de mais de 200 gêneros e 2.300 espécies catalogadas (MORAES, 2002; SOUZA et al., 2005). A Mata Atlântica é apontada como o principal habitat brasileiro das orquídeas, podendo ser encontradas espécies endêmicas de expressivo valor ornamental e comercial, como *Cattleya warneri*, *C. labiata* e *Laelia purpurata*, esta considerada a flor símbolo do estado de Santa Catarina (FARIAS & RIBEIRO, 2000).

Caracterizam-se morfológicamente por apresentar flores contendo três sépalas e três pétalas, fazendo com que uma das pétalas se apresente de forma diferenciada e com a função de atrair agentes polinizadores (SILVA, 2003; SUTTLEWORTH et al., 1997). No Brasil e em outros países, as orquídeas têm um grande valor comercial, devido a sua beleza, diversidade de cores, formas e durabilidade das flores, além de algumas espécies apresentarem propriedades medicinais e culinárias (CARVALHO et al., 2013; PASQUAL et al., 2011; SUZUKI; 2014).

As orquídeas são consideradas atualmente como um símbolo de cuidado e conservação da natureza e correspondem a 7% das plantas ornamentais do mundo (MENEGUCE et al., 2004; SILVA, 2003). O mercado de orquídeas tem aumentado sucessivamente, devido à beleza, exotismo e fragrância de suas flores (NEVES, 2011). Os gêneros com maior destaque econômico mundial são *Cattleya*, *Cymbidium*, *Dendrobium*, *Miltoniopsis*, *Phalaenopsis* e *Zygopetalum*, que colaboram na economia de diversos países (LOPEZ & RUNKLE.; 2005).

3.2 Gênero *Cattleya*

Orquídeas do gênero *Cattleya* são nativas do Brasil com ocorrência no México, América Central e América do Sul, havendo inúmeras espécies e milhares de híbridos que apresentam flores vistosas e coloridas (BICALHO, 1980; PAULA & SILVA, 2004). É um gênero Neotropical com 114 espécies, dividido em diversos subgêneros, sendo mais da metade das espécies exclusivas do Brasil (VAN DEN BERG, 2014).

Este gênero possui importância para o cultivo de flores de corte, e resulta em um dos mais belos ornamentos das matas tropicais e subtropicais da América (RAPOSO, 1993). O gênero *Cattleya* apresenta como característica a presença de flores de tamanho grande e o labelo não fundido à coluna (WITHNER, 1988), em decorrência dessas características estabelecem um atrativo para o público e seus colecionadores, sendo que o consumo de flores e plantas ornamentais vem aumentando ao longo dos anos no planeta (DRESSLER, 1993; VAN DEN BERG, 2014). Em consequência desta grande procura pelo mercado consumidor, orquídeas desse gênero apresentam riscos em relação ao desaparecimento de suas populações e também ameaças de extinção (CRUZ et al., 2003).

No estado de Santa Catarina, o gênero *Cattleya* é representado por oito espécies de orquídeas, sendo estas aceitas: *C. cernua*, *C. coccinea*, *C. forbesii*, *C. guttata*, *C. intermedia* Graham, *C. mantiqueirae*, *C. porphyroglossa* e *C. tigrina*. Populações dessas espécies podem ser encontradas na ilha de Santa Catarina e nos seus arredores, ou em outros locais do estado (SIQUEIRA et al.; 2014).

3.3 Espécie *Cattleya intermedia* Graham ex Hook.

A espécie *C. intermedia* é uma orquídea endêmica do Brasil, com ocorrência na Floresta Atlântica, principalmente nas regiões Sul e Sudeste (BARROS et al., 2013). Têm preferência por locais em altitude entre 0 e 50 m, podendo ser encontrada em altitudes de até 300 m (NETO et al., 2013). É uma planta que apresenta fácil cultivo, rusticidade e tolerância a baixas temperaturas, além de possuir uma grande variedade de cores das suas pétalas, que vai deste o branco até o rosa (HUBNER, 2003). Essa espécie pode crescer até 35 cm de altura, possuindo pseudobulbos bifoliados, eretos e cilíndricos, e folhas oblongas horizontais ou semieretas. A inflorescência contém de duas a cinco flores (BUZATTO et al., 2010).

Plantas dessa espécie vêm sofrendo intensas atividades de extração por consequência de seu elevado valor ornamental, provocando declínio de suas populações naturais (CRUZ et al., 2003). Atualmente a *C. intermedia* está inserida na lista de espécies ameaçadas da flora do estado do Rio Grande do Sul (RIO GRANDE DO SUL, 2014) e na categoria vulnerável da lista vermelha da flora do Brasil (NETO et al., 2013).

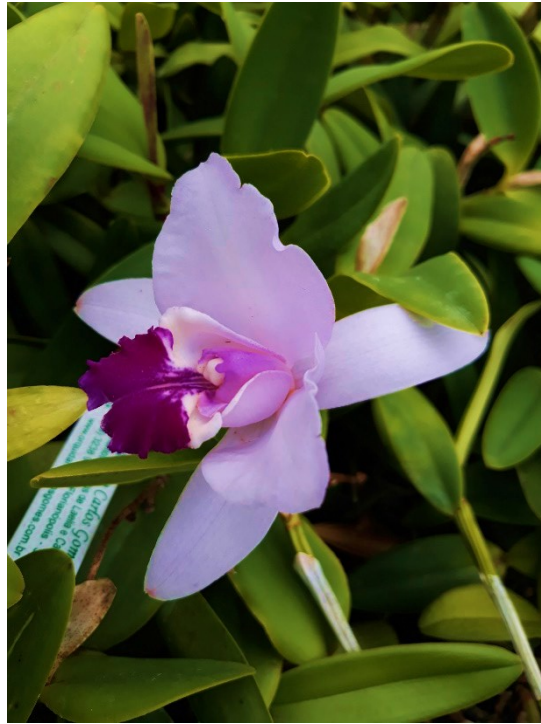


Figura 1 Flor da espécie *Cattleya intermedia* Graham ex Hook.

Fonte: Autor, 2019.

3.4 Sementes de orquídeas

As orquídeas são conhecidas por apresentar sementes com minúsculo tamanho, de acordo com as espécies, o tamanho das sementes varia entre 0,05 a 6 mm e seu peso de 0,24 a 0,31 μg . Uma única cápsula pode conter de 20 a 4 milhões de sementes em seu interior (ARDITTI & GHANI, 2000). Estas variam em forma, tamanho, morfologia e cor. Podem ser elipsoidais, fusiformes, clavadas, filiformes ou aladas. Em algumas famílias, as sementes contêm um firme tegumento, este envolve e protege a estrutura do embrião (MOLVRAY & KORES, 1995).

De acordo com Yeung (2017) o embrião apresenta um número reduzido de células, sendo pouco desenvolvido. Contém as principais reservas encontradas nessas sementes, como proteínas de reserva, lipídios, e eventualmente pode ocorrer a presença de grânulos de amido.

Estas reservas são consideradas mínimas para promover a germinação dessas sementes na natureza.

A família Orchidaceae apresenta diferenças em relação a maioria das famílias botânicas, visto que suas sementes não apresentam reservas nutritivas suficientes para promover o fenômeno de germinação (RAMOS, 1969). Estima-se que aproximadamente 5% das sementes sejam capazes de germinar em condições naturais, pois a germinação dessas sementes somente ocorre na presença de fungos específicos, ou seja, dependem de associações micorrízicas para a germinação e estabelecimento do protocormo em seu ambiente natural (ARDITTI, 1979; LEROUX et al., 1997; PEREIRA et al., 2003).

Arditti e Ghani (2000) informam que as sementes de orquídeas detêm algumas limitações que estão relacionadas ao processo germinativo, como exemplo a espessura da parede das células do tegumento e a quantidade insuficiente de endosperma presentes no embrião. Adicionalmente estas sementes podem germinar sem estar em associação com fungos, sendo cultivadas em meio de cultura com nutrientes minerais, carboidratos e outros compostos orgânicos, sendo chamado de cultivo assimiótico ou sementeira *in vitro* (JOHNSON et al., 2012).

Os meios nutritivos usados fornecem substâncias essenciais para o crescimento das plantas. Para as orquídeas os meios nutritivos mais empregados são o MS e o Knudson, que promovem rapidez e uniformidade na obtenção de plântulas, a vista que, na natureza a taxa de germinação e crescimento são considerados baixos (CALDAS et al., 1998; MURASHIGE & SKOOG, 1962; KNUDSON, 1922; ARDITTI & KRIKORIAN, 1996; STEWART & KANE, 2006).

Como na natureza a taxa de germinação de sementes é baixa e o desenvolvimento das plântulas é considerado lento, essa técnica da sementeira *in vitro* possibilita uma maior rapidez e uniformidade para a obtenção de plântulas (ARDITTI & KRIKORIAN, 1996; STEWART & KANE, 2006). Além de apresentar um conceito comercial e ecológico relevante, as plantas produzidas dessa maneira são extremamente importantes para programas de reintrodução de espécies nativas em áreas de preservação ambiental (UNEMOTO et al., 2007).

3.5 Conservação de sementes de orquídeas

A conservação da biodiversidade abrange os métodos *in situ* e *ex situ*. Entende-se por conservação *in situ* a manutenção das espécies no seu habitat natural, já a conservação *ex situ*

compreende as diversas ações em que o material conservado é retirado e mantido fora do seu habitat natural (BRASIL, 2000). Esses métodos vêm sendo desenvolvidos e aplicados para as mais diferentes plantas de interesse econômico e conservacionista (BAJAJ, 1995).

Para as sementes a conservação *ex situ* pode ser realizada através do armazenamento das mesmas em condições de baixa temperatura e umidade, resfriamento em congelador, congelamento em freezer ou o método de criopreservação em nitrogênio líquido (SARMENTO & VILLELA, 2010). Na conservação *ex situ* quando as sementes são armazenadas de forma adequada tem-se um favorecimento na eficiência do processo produtivo. Além de proporcionar um maior período de armazenamento, tem a vantagem de ocupar menores espaços e custos menos elevados (MELLO, 2000).

Para as sementes de orquídeas, o uso do banco de sementes de germoplasma na conservação *ex situ* ainda necessita da disponibilidade de conhecimentos eficientes para permitir a definição da melhor temperatura e umidade para o seu armazenamento (PRITCHARD & SEATON, 1993).

3.6 Armazenamento de sementes de orquídeas

Uma prática que está sendo desenvolvida por produtores e colecionadores de orquídeas é o armazenamento de sementes e pólen em baixas temperaturas (ARDITTI & ERNST, 1992). Essa técnica proporciona melhor manutenção da qualidade, sendo indispensável para a conservação dos recursos genéticos das espécies, porém, necessita em especial do entendimento comportamental das mesmas durante as condições nas quais serão submetidas (CHAVES, 2001).

O armazenamento de sementes consiste em um conjunto de técnicas e procedimentos realizados com o objetivo de manter a qualidade inicial das mesmas. Condições de baixa luminosidade, temperatura e umidade são ideais para garantir uma melhor conservação da qualidade fisiológica, além de permitir uma maior longevidade (BONOME et al., 2006; FLORIANO, 2004). O controle de fatores como a temperatura e umidade relativa é indispensável no processo de perda de viabilidade das sementes e alterações na qualidade durante o armazenamento (KONG et al., 2008; MALAKER et al., 2008). A redução da temperatura é uma das técnicas mais viáveis e utilizadas para a preservação da qualidade de sementes armazenadas (DEMITO & AFONSO, 2009).

Em relação ao seu comportamento, as sementes podem ser classificadas em ortodoxas, quando armazenadas com baixo teor de umidade sem comprometer a sua viabilidade, recalcitrantes quando a sua viabilidade depende de altos valores de umidade, e intermediárias, quando possuem longevidade crescente quanto menor for o teor de umidade e vice-versa (HOPPE, 2004). As sementes da maioria das espécies de orquídeas são consideradas ortodoxas, podendo ser armazenadas em temperatura ambiente ou em condição de geladeira, porém a viabilidade dessas sementes pode ser reduzida quando exposta a estas práticas (PRITCHARD et al.; 1999).

3.7 Criopreservação

A criopreservação é compreendida como uma técnica de conservação do material biológico em nitrogênio líquido (-196°C) ou na fase de vapor (-150°C) com consequente paralisação do metabolismo celular (ENGELMANN, 2004). Devido à redução metabólica que ocorre nas células quando as mesmas são submetidas às temperaturas criogênicas, o material vegetal pode ser armazenado por um período ilimitado, com a retomada do desenvolvimento celular normal após o seu descongelamento (PANIS & LAMBARDI, 2005; MELETTI et al., 2007, PEGG, 2007).

O método de criopreservação se apresenta como uma opção viável para a conservação em longo prazo, sendo essa uma das vantagens em relação aos demais métodos de conservação (ENGELMANN, 2011; GOLDFARB et al., 2008). Nessas condições o armazenamento pode ser realizado por um período indeterminado, sem que ocorram divisões celulares e alterações metabólicas (WESLEY-SMITH et al., 2014). Além de manter a estabilidade genética do material e suas características, esse método necessita de pouco espaço e manutenção (ENGELMANN, 1997). O material criopreservado é exposto a baixas temperaturas, inativando a respiração e processos enzimáticos, possibilitando às células uma estrutura intacta e, após o descongelamento, as mesmas retornam as suas atividades normais (TOMBLATO et al., 2009; BAJAJ, 1995).

Para a criopreservação de espécies da família Orchidaceae são utilizados diferentes órgãos vegetais, como sementes, pólen, protocormos, suspensão de células e embriões zigóticos (VENDRAME et al., 2014). A criopreservação de sementes é uma maneira fácil, comum e eficiente de conservação *ex situ*, sendo que estruturas menores são mais adequadas para a utilização deste método, pois a desidratação e o congelamento ocorrem de forma mais uniforme

e rápida. As etapas de desidratação, congelamento, descongelamento e regeneração são críticas para o sucesso da criopreservação (SANTOS, 2000).

Segundo Hirano et al. (2009), na literatura são encontrados diferentes protocolos em relação ao tempo de estocagem do material em nitrogênio líquido, entre 30 minutos até dois meses. O tempo de armazenamento do material também irá depender da especificidade de cada gênero e espécie, pois não é comum que os diferentes materiais quando expostos a temperatura ultrabaixas continuem viáveis (VALOIS et al., 2001).

3.8 Viabilidade, vigor e germinação de sementes

Uma característica importante em sementes é a viabilidade, que tem como definição a habilidade de germinação por períodos variáveis e geneticamente determinados. Fatores ambientais e as condições de armazenamento impostas possuem efeitos decisivos na viabilidade das sementes de qualquer espécie (MALAVASI, 1988). Outro aspecto relevante é o vigor e, segundo o Comitê de Vigor Internacional de Análise de Sementes (ISTA), este se apresenta como um conjunto de características que determinam a atividade e o desempenho dos lotes de sementes, tendo uma porcentagem de germinação comercialmente aceitável, em condições de ambientes favoráveis ou desfavoráveis, ou seja, sementes que apresentam um bom desempenho são consideradas vigorosas e as de baixo desempenho são consideradas sementes de baixo vigor (ISTA, 2006).

A germinação de sementes é um processo fundamental no ciclo de vida das plantas, que consiste em um conjunto de eventos fisiológicos e bioquímicos de reativação do crescimento ativo do embrião, ocorrendo o rompimento do tegumento da semente e a emergência da plântula (MEI & SONG, 2010; MALAVASI, 1988). Esse processo é influenciado por diversos fatores, tais como a temperatura, luz, água e a composição dos gases na atmosfera, atuando isoladamente ou com interação entre eles (POPINIGIS, 1985; BORGES & RENA, 1993).

Na família Orchidaceae, a germinação de sementes em condições naturais ocorre com o início do intumescimento da semente que promove o rompimento do tegumento seminal e a liberação do embrião. O embrião se desenvolve em uma estrutura tuberiforme, geralmente clorofilada, denominada de protocormo (ARDITTI & ERNST, 1992). O protocormo permanece assim até que seja infectado por um fungo micorrízico adequado, tendo então início a formação

da gema vegetativa e dos primórdios foliares (HARRISON, 1977). A formação da raiz se dá início posteriormente, após o surgimento de várias folhas (VEYRET, 1974; ARDITTI, 1992).

A estrutura que caracteriza a interação entre a orquídea e o fungo micorrízico é denominada de pelotons, que se caracteriza por ser um enovelado de hifas fúngicas que é formado no espaço intracelular das células parenquimáticas do embrião (PETERSON et al., 2004; RASMUSSEN, 1995; SMITH & READ, 1997). Através da degradação dos pelotons, o embrião, protocormo e raízes da orquídea adquirem o carbono e os minerais adequados para o desenvolvimento da planta (CAMERON et al., 2006; 2007).

3.9 Testes para avaliação da qualidade das sementes

A utilização de testes rápidos em programas para o controle da qualidade de sementes é uma ferramenta fundamental para a avaliação da sua qualidade fisiológica e merece a atenção dos produtores e pesquisadores (DEMINICIS et al., 2009). De acordo com Popinigis (1977) os parâmetros de viabilidade e vigor são os principais aliados para determinar o nível da qualidade das sementes, e a viabilidade pode ser avaliada através do teste de germinação.

O teste de germinação é fundamental para a avaliação da qualidade fisiológica das sementes e permite conhecer o potencial de germinação de um lote em condições favoráveis (CARVALHO & NAKAGAWA, 2000). Os testes devem seguir as normas recomendadas pelo RAS- Regras para Análise de Sementes, que normatiza a análise de sementes, para que a germinação ocorra em condições ótimas para cada espécie. Contudo, para espécies florestais, em particular as nativas, como as orquídeas, há uma escassez de padrões definidos de germinação, pois poucas espécies estão incluídas no RAS (BRASIL, 1992). Geralmente, para as espécies de orquídeas esse teste pode ser realizado em diferentes meios de cultura, sendo este denominado de semeadura *in vitro* (JOHNSON et al., 2012).

Como complemento ao teste de germinação, empregam-se testes de vigor para obtenção de informações adicionais sobre a qualidade das sementes (DUTRA & MEDEIROS FILHO, 2008). O teste de tetrazólio é utilizado concomitantemente ao teste de germinação, pois permite verificar com aptidão parâmetros que envolvem a viabilidade e o vigor das sementes, além de distinguir possíveis danos no material que podem comprometer a sua qualidade final (GUEDES et al., 2010; MARCOS FILHO, 2015; FRANÇA NETO, 1999).

3.10 Caracterização anatômica e química de sementes

Os estudos anatômicos contribuem para a compreensão de vários fenômenos como respostas morfológicas, assim como o entendimento do desenvolvimento dos diversos tecidos vegetais (APPEZZATO- DA- GLÓRIA & CARMELLO GUERREIRO, 2003). Segundo Amorim (1996) o conhecimento de estruturas morfológicas e anatômicas de frutos, sementes e plântulas são importantes para diversas finalidades como: laboratório de análise de sementes, identificação e diferenciação de espécies, reconhecimento da planta a campo, silvicultura e taxonomia. Além disso, auxilia na identificação de espécies em estudos de regeneração natural de áreas degradadas (ARAÚJO NETO et al., 2002). Conforme Kuniyoshi (1983), o estudo da estrutura da semente é de extrema importância, pois assim é possível obter informações sobre germinação, armazenamento, viabilidade e métodos de semeadura.

O conhecimento da composição química e dos mecanismos de deposição e mobilização de reserva torna-se indispensável para a de produção de sementes, pois tanto a germinação, vigor e potencial de armazenamento são influenciadas pelos compostos presentes nas sementes (BUCKERIDGE, 2004; BEWLEY et al., 2013). Os compostos acumulados nas sementes têm a função de fonte de energia para manter os processos metabólicos em funcionamento como também são fonte de matéria para a produção dos tecidos vegetais da plântula (FERREIRA et al., 2009). As reservas têm papel decisivo no processo de germinação e na construção da plântula. No decorrer dos estágios iniciais de desenvolvimento a nova planta a ser formada dependerá das reservas armazenadas nas sementes para o seu desenvolvimento (BEWLEY & BLACK, 1994).

Segundo Borges & Rena (1993) as principais substâncias de reservas nas sementes são os carboidratos, proteínas e lipídios, sendo que a sua proporção pode variar de espécie para espécie. As sementes de orquídeas apresentam-se como exceção, pois no seu embrião são encontradas poucas células de reservas, com predomínio de reservas proteicas e lipídicas (ARDITTI, 1992; DRESSLER, 1993; CLEMENTS, 1999, HARRISON, 1977).

4 REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, V. **Análises de amido, proteína, poliaminas e metilação do DNA em *Cattleya tigrina* A. Richard (Orchidaceae)**. Dissertação. Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.
- ALTAFIN, V. L.; MENEZES, M. O.; LIMA, F. R. R.; PITOMBO, L. M. **Semeadura *in vitro* de orquídeas para propagação massal**. Boletim Técnico n. 7. Fundação Pinhalense de Ensino Centro Regional Universitário de Espírito Santo do Pinhal. p. 14, 2004.
- AMORIM, I. L. Morfologia de frutos, sementes, germinação, plântulas e mudas de espécies florestais da região de Lavras - MG. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, p. 127, 1996.
- ANDRIOLLI, B. **Criopreservação de sementes e caracterização morfo histológica da germinação *in vitro* de *Cattleya crispa***. Dissertação. Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2019.
- APEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. **Anatomia vegetal**. Viçosa, Ed. UFV, p. 406-407, 2003.
- ARAÚJO NETO, J. C.; AGUIAR, I. B.; FERREIRA, V. M.; PAULA, R. C. Caracterização morfológica de frutos e sementes e desenvolvimento pós-seminal de monjoleiro (*Acacia polyphylla* DC.). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 24, n. 1, p. 203-211, 2002.
- ARDITTI, J. **Aspects of the physiology of orchids**. Advances in Botanical Research, London, v. 7, p. 421-655, 1979.
- ARDITTI, J. **Fundamentals of orchid biology**. New York: John Wiley & Sons, 1992.
- ARDITTI, J.; ERNST, R. **Micropropagation of orchids**. New York: John Wiley & Sons, Interscience publication, p. 682-691, 1992.
- ARDITTI, J.; GHANI, A. K. A. Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. **New Phytologist**. p. 367-421, 2000.
- ARDITTI, J.; KRIKORIAN, A. D. Orchid micropropagation: the path from laboratory to commercialization and an account of several unappreciated investigators. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 122, p. 183-241, 1996.
- BAJAJ, Y. P. S. **Cryopreservation of plant cell, tissue, and organ culture for the conservation of germplasm and biodiversity**. In: BAJAJ, Y. P. S. ed. Cryopreservation of plant germplasm I. Biotechnology in Agriculture and Forestry, v. 32, Berlin, Springer, p. 3-28, 1995.
- BARROS, F. de. Diversidade taxonômica e distribuição das Orchidaceae brasileiras. **Acta Botanica Brasílica**. v. 4, p. 177- 187, 1990.

BARROS, F.; VINHOS, F.; RODRIGUES, V. T.; BARBERENA, F. F. V. A.; FRAGA, C. N.; PESSOA, E. M.; FOSTER, W. Orchidaceae in *Lista de Espécies da Flora do Brasil*, 2013.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. 2. ed. Plenum. New York, 1994.

BEWLEY, J. D.; BRADFORD, K. J.; HILHORST, H. W. M., NONOGAKI, H. **Sementes - fisiologia do desenvolvimento, germinação e dormência**. 3. ed. Nova York, Springer, 2013.

BICALHO, H. D.; Aspectos ornamentais e taxionômicos das orquídeas gênero *Cattleya* no continente sul-americano. In: CONGRESSO DA ESCOLA SUPERIOR AGRÔNOMICA LUIZ DE QUEIROZ, Piracicaba: ESALQ, **Anais**. p. 157 – 168, 1980.

BONOME, L. T. S. Alterações fisiológicas, bioquímicas e moleculares em sementes de seringueira (*Hevea brasiliensis* (Willd. Ex Adr de Juss.) Muell.-Arg.) durante o armazenamento. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal). Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

BONNER, F. T.; KARRFALT, R. P. **The woody plant seed manual**. Washington: U.S. Department of Agriculture-Forest Service, p. 1224, 2008.

BORGES, E. E. L.; RENA, A. B. Germinação de sementes. In: AGUIAR, I. B.; PINARODRIGUES, F. C. M.; FIGLIOLIA, M. B. **Sementes florestais tropicais**. Brasília: ABRATES. p. 83-135-350, 1993.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília, DF: SNDA/ DNDV/CLV, p. 365, 1992.

BRASIL. **Convenção sobre Diversidade Biológica**. Conferência para Adoção do Texto Acordado da CDB – Ato Final de Nairobi. Brasília, Ministério do Meio Ambiente/SBF, 2000.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília, p. 395, 2009.

BRUSTULIN, J.; SCHMITT, J. L. Composição florística, distribuição vertical e floração de orquídeas epifíticas em três parques municipais do estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Pesquisas Botânica**, 59: 143-158, 2008.

BUCKERIDGE, M. S. Acúmulo de Reservas. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, p. 324, 2004.

BUZATTO, C. R.; FERREIRA, P. P. A.; WELKER, C.A. D.; SEGER, G. D. S.; HERTZOG, A.; SINGER, R. B. O gênero *Cattleya* Lindl. (Orchidaceae: *Laeliinae*) no Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, p. 388-398, 2010.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, EMBRAPA, v.1, p. 87-132, 1998.

CAMERON, D. D.; LEAKE, J. R.; READ, D. J. Mutualistic mycorrhiza in orchids: evidence from plant-fungus carbon and nitrogen transfers in the green-leaved terrestrial orchid *Goodyera repens*. **New Phytologist**. p. 405-416, 2006.

CAMERON, D. D.; JOHNSON, I.; LEAKE, J. R.; READ, D. J. Mycorrhizal acquisition of inorganic phosphorus by the green-leaved terrestrial orchid *Goodyera repens*. **Annals of Botany**. p. 831-834, 2007.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4. ed. Jaboticabal: Funep, p. 588, 2000.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 5. ed. FUNEP: Jaboticabal, p. 590, 2012.

CARVALHO, A. C. P. P.; TOMBOLATO, A. F. C.; RODRIGUES, A. A. de J.; SANTOS, E. de O.; SILVA, F. **Panorama da cultura de tecidos no Brasil com ênfase em flores e plantas ornamentais**. In: JUNGHANS, T. G.; SOUZA, A. da S. (ed). Aspectos práticos da micropropagação de plantas. 2. ed. Embrapa, p. 13-53, 2013.

CHASE, M.W. Classification of Orchidaceae in the age of DNA data. *Curtis's Botanical Magazine*, v. 22, p. 2-7, 2005.

CHAVES, M. F. Previsão da longevidade de sementes de *Dimorphandra mollis* Benth (Faveiro) e *Dalbergia nigra* (Vell. Fr. All. ex Benth. Jacarandá da Bahia). Tese (Doutorado em Concentração Tecnologia Pós-colheita) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas/SP, 2001.

CLEMENTS, M. A. **Embryology**. In: PRIDGEON, A.M.; CRIBB, P.J.; CHASE, M.W. (eds.). *Genera Orchidacearum: general introduction, Apostasioideae, Cypripedioideae*. Oxford: Oxford University Press, p. 38-58, 1999.

COLOMBO, L. A.; FARIA, R. T.; CARVALHO, J. F. R. P.; ASSIS, A. M.; FONSECA, I. C. B. Influência do fungicida clorotalonil no desenvolvimento vegetativo e no enraizamento *in vitro* de duas espécies de orquídeas brasileiras. **Acta Scientiarum**, Maringá, v.6, n.2, p.253-258, 2004.

CORTE, V. B.; BORGES, E. E. de L.; VENTRELLA, M. C.; LEITE, I. T. de A.; BRAGA, A. J. T. Histochemical aspects of reserves mobilization of *Caesalpinia peltophoroides* (Leguminosae) seeds during germination and seedlings early growth. **Revista Árvore**, p. 641-650, 2008.

CRUZ, D. T.; BORBA, E. L.; BERG, C. V. D. O gênero *Cattleya* Lindl. (Orchidaceae) no Estado da Bahia, Brasil. **Sitientibus, Série Ciências Biológicas**. p.26-34, 2003.

DE CONTI, D. **Caracterização fisiológica e bioquímica do padrão de desenvolvimento de estruturas semelhantes à protocormos de *Cattleya tigrina* A. Richard.** Tese. Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

DEMNICIS, B. B; VIEIRA, H.D; SILVA, R.F da. Teste de tetrazólio para avaliação da qualidade de sementes de *Clitoria ternatea* L. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, p. 54-62, 2009.

DEMITO, A.; AFONSO, A. D. L. **Qualidade das sementes de soja resfriadas artificialmente.** **Engenharia na Agricultura**, v. 17, p. 7-14, 2009.

DRESSLER, R. L. **Phylogeny and classification of the orchid family.** Portland, Oregon Dioscorides Press, p.314, 1993.

DUCLERCQ, J. S.; BRIGITTE, C.; MANUELLA, S. R. De novo shoot organogenesis: from art to science. **Trends in plant science**. v. 16, p. 597-606, 2011.

DUTRA, A. S.; MEDEIROS FILHO, S. Teste de deterioração controlada na determinação do vigor em sementes de algodão. **Revista Brasileira de Sementes**, Fortaleza, v. 30, p. 19-23. 2008.

ENGELMANN, F. Importance of desiccation for the cryopreservation of recalcitrant seed and vegetatively propagated species. **Plant Genetic Resources Newsletter**, p. 9-18, 1997.

ENGELMANN, F. Plant cryopreservation: progress and prospects. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 40, p. 427-433, 2004.

ENGELMANN, F. Uso de biotecnologias para a conservação da biodiversidade vegetal. **Celular in vitro e biologia do desenvolvimento - Planta**, v. 47, p. 17-25, 2011.

ENGELS, J.; RAO, V. R.; BROWN, A. H. D.; JACKSON, M. T. **Managing plant genetic diversity.** Wallingford, UK: CABI, 2002.

FARIA, R. T; ASSIS, A. M; CARVALHO, J. F. R. P. **Cultivo de orquídeas.** Londrina: Mecenias, p.208, 2010.

FARIAS, L. A.; RIBEIRO, R. Pôster apresenta orquídeas na Mata Atlântica. **Revista O Mundo das Orquídeas**, p. 43-45, 2000.

FERREIRA, C. S. The role of carbohydrates in seed germination and seedling establishment of *Himatanthus siccuba*, an Amazonian tree with populations adapted to flooded and nonflooded conditions. **Annals of Botany**, p. 1111–1119, 2009.

FLORA DO BRASIL. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: < <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/> >. Acesso em: 03 fev. 2020.

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

FRANÇA NETO, J. B. Teste de tetrazólio para determinação do vigor de sementes. In: KRZYŻANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J. B. (Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, p. 218, 1999.

GALLI, J. A.; SOARES, M.B.; BARTINS, A. L. M. Período de armazenamento e da massa na germinação de sementes de mangueira da variedade carabão. **Biotemas**, v. 25, n. 3, p. 129133, 2012.

GARAY, L. A. On the origin of the Orchidaceae II. **Journal of the Arnold Arboretum**, v. 53, p. 202-215, 1972.

GIVNISH, T. J.; SPALINK, D.; AMES, M.; LYON, S. P.; HUNTER, S. J.; ZULUAGA, A.; ILES, W. J. D.; CLEMENTES, M. A.; ARROYO, M. T. K.; MACK, J. L.; ENDARA, L.; KRIEBEL, R.; NEUBIG, K. M.; WHITTEN, W. M.; WILLIAMS, N. H.; CAMERON, K. M. Orchid phylogenomics and multiple drivers of their extraordinary diversification. *Proc. R. Soc. B*, 2015.

GOLDFARB, M. Crioconservação e sanidade de sementes de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.). Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) - Universidade Federal da Campina Grande, Campina Grande, 2008.

GOLDFARB, M.; DUARTE, M. E. M.; MATA, M. E. R. M. Armazenamento criogênico de sementes de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) Euphorbiaceae. **Biotemas**, p.27-33, 2010.

GUEDES, R. S.; ALVES, E. U.; GONÇALVES, E. P.; VIANA, J. S.; SILVA, K. B.; GOMES, M. S. S. Metodologia para o teste de tetrazólio em sementes de *Amburana cearensis* (Allemão) AC Smith. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, p. 120-126, 2010.

GUERRA, M. P.; DAL VESCO. In vitro morphogenesis and adventitious shoot mass regeneration of *Vriesea reitzii* from nodular cultures. *Science Horticulture*, v. 125, p. 748-755, 2010.

HARRISON, C. R. Ultrastructural and histochemical changes during the germination of *Cattleya aurantiaca* (Orchidaceae). **Botanical Gazette**, v. 138, p. 41-45, 1977.

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

HONG, T. D.; LININGTON, S.; ELLIS, R. H. Seed storage behaviour: a compendium. Rome: **International Plant Genetic Resources Institute**; 1996.

HOPPE, J. M. Produção de sementes e mudas florestais - **Caderno Didático**. 2. ed. Santa Maria, 2004.

HUBNER, M. Por que cultivamos a *Cattleya intermedia*? **O mundo das orquídeas**, n. 26, p. 6-11, 2003.

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. Seed vigor testing. Zurich: **International Rules for Seed Testing**, p. 303, 2006.

IRIONDO, A. Conservación de germoplasma de especies raras y amenazadas (revisión). **Invest. Agr. Prod. Prot. Veg.** 16, 2001.

JOHNSON, T. R.; KANE, M. E.; PÉREZ, H. E. Examining the interaction of light, nutrients and carbohydrates on seed germination and early seedling development of *Bletia purpurea* (Orchidaceae). **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 63, p. 89-99, 2012.

KERBAUY, G. B. Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds). Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: CBAB/EMBRAPA. (519-531), 1998.

KNUDSON, L. Nonsymbiotic germination of orchids seeds. **Botanical Gazette**, v. 73, p. 1-25, 1922.

KONG, F.; CHANG, S. K. C.; LIU, Z.; WILSON, L. A. Changes of soybean quality during storage as related to soymilk and tofu making. **Journal of Food Science**, v. 73, p. 134-144, 2008.

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

KUNIYOSHI, Y. S. **Morfologia da semente e da germinação de 25 espécies arbóreas de uma floresta com araucária**. (Dissertação de mestrado) - Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, p. 233, 1983.

LEMOS FILHO, J. P.; DUARTE, R. J. Germinação e longevidade das sementes de *Swietenia macrophylla* King Mogno (*Meliaceae*). **Revista Árvore**, Viçosa, v. 25, p. 125-130, 2001.

LEROUX, G.; BARABÉ, D.; VIETH, J. Morphogenesis of the protocorm of *Cypripedium acaule* Aiton (Orchidaceae). **Plant Systematics Evolution**, v. 205, n. 1, p. 53 - 72, 1997.

LIZ, R. D. **Elucidação da morfo histodiferenciação do desenvolvimento de protocormos e estruturas semelhantes a protocormos (ESPs) de espécies de *Cattleya* Lindl. Micropropagadas**. Dissertação. Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

LIZ, R. D. **Citometria de fluxo, análises ultraestruturais e bioquímicas de estruturas semelhantes a protocormos ESPs de *Cattleya tigrina* A. Richard**. Tese. Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.

LOPEZ, G. R.; RUNKLE, E. S. Environmental physiology of growth and flowering of orchids. **Hortscience**, v. 40, p. 1969-1973, 2005.

MALAKER, P. K.; MIAN, I. H.; BHUIYAN, K. A.; AKANDA, A. M.; REZA, M. M. A. Effect of storage containers and time on seed quality of wheat. **Journal of Agricultural Research**, v. 33, p. 469-477, 2008.

- MALAVASI, M. M. Germinação de sementes. In: PIÑA-RODRIGUES, F. C. M. (Coord.) **Manual de análises de sementes florestais**. Campinas: Fundação Cargil. p. 44-67, 1988.
- MARCOS FILHO, J.; CICERO, S.M.; SILVA, W. R. **Avaliação da qualidade de sementes**. Piracicaba: FEALQ. p. 230, 1987.
- MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. 2. ed. Londrina: Abrates, p. 659, 2015.
- MEDEIROS, A. C. S.; CAVALLAR, D. A. N. Conservação de germoplasma de aroeira (*Astronium urundeuva* (Fr. All.) EngL). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 14, n. 1, p. 713-75, 1992.
- MEI, Y.; SONG, S. Response to temperature stress of reactive oxygen species scavenging enzymes in the cross-tolerance of barley seed germination. **Journal of Zhejiang University**, v. 11, n. 12, p. 965-972, 2010.
- MELETTI, L. M. M.; BARBOSA, W.; VEIGA, R. F. A.; PIO, R. Criopreservação de sementes de seis acessos de maracujazeiro. **Scientia Agraria Paranaensis**. v. 6, p. 13-20, 2007.
- MELLO, C. M. C. **Conservação de sementes de orquídeas do cerrado**. Dissertação (Mestrado em Biologia) – Universidade de Brasília, Brasília, 2000.
- MENDES, R. A. **Estudo da propagação *in vitro* de *Manihot glaziovii* Mull. Arg (Euphorbiaceae) parente silvestre da mandioca**, Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1995.
- MENEGUCE, B.; OLIVEIRA, R. B. D.; FARIA, R. T. Propagação vegetativa de *Epidendrum ibaguense* Lindl. (Orchidaceae) em substratos alternativos ao xaxim. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 25, p. 101-106, 2004.
- MILLER, D.; WARREN, R. **Orquídeas do Alto da Serra da Mata Atlântica pluvial do Sudeste do Brasil**. Rio de Janeiro: Salamandra, p. 256, 1996.
- MORAES, C. P. **Fenologia e anatomia dos órgãos reprodutivos de *Catasetum fimbriatum* L. cultivados sob diferentes intensidades luminosas**. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiróz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.
- NAKAGAWA, J.; IMAIZUMI, I.; ROSSETTO, C. A. V. Efeitos de algumas fontes de fósforo e da calagem na qualidade de sementes de amendoim. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, p. 505- 512, 1990.

NETO, L. M.; BARROS, F. de V.; F.; FURTADO, S. G.; JUDICE, D. M.; FERNANDEZ, E. P.; SFAIR, J. C.; BARROS, F. S. M.; PRIETO, P. V.; KUTSCHENKO, D. C.; MORAES, M. A.; ZANATA, M. R. V.; FILHO, L. A. F. S. 2013. Orchidaceae. In: MARTINELLI, G.; MORAES, M. A. (Orgs.) Livro Vermelho da Flora do Brasil. Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2013.

NEVES, M. I. R. S. **Propagação *in vitro* de orquídeas nativas de Alagoas - *Prosthechea fragrans* e *Maxillaria splendens***. Universidade Federal de Alagoas, 2011.

OTEGUI, M. LIMA, C.; MALDONADO, S.; LEDERKREMER, R. M. de. Histological and chemical characterization of *Myrsine laetevirens* seed. **International Journal Plant Science** 159: 762-772, 1998.

PANIS, B.; LAMBARDI, M. Status of cryopreservation technologies in plants (crops and forest trees). **The role of biotechnology**. Anais. Vila Gualino, 2005.

PASQUAL, M.; SOARES, J. D. R.; RODRIGUES, F. A.; ARAUJO, A. G.; SANTOS, R. R. Influência da qualidade de luz e silício no crescimento *in vitro* de orquídeas nativas e híbridas. **Horticultura Brasileira**, v. 29, p. 324-329, 2011.

PAULA, C. C.; SILVA, H. M. P. **Cultivo prático de orquídeas**. 3. ed. Viçosa, UFV. p. 106, 2004.

PEGG, D. E. Cryopreservation and freeze-drying protocols methods. Cryopreservation and freeze-drying protocols. v. 368, **Humana Press Inc**, p. 39-57. 2007.

PEREIRA, O. L.; ROLLEMBERG, C. L.; KASUYA, M. C. M. Association des mycorrhizies dans les orchidees – perspectives utilisation dans les programmes de propagation symbiotique. **Orchides**, v. 55, p. 24-27, 2003.

PETERSON, R. L.; MASSICOTTE, H. B.; MELVILLE, L. H. **Mycorrhizas: anatomy and cell biology**. NRC, Research Press, 2004.

POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente**. Brasília: Ministério da Agricultura. p. 232, 1977.

POPINIGIS, F. **Fisiologia das sementes**. Ministério da Agricultura. Brasília. 1985.

PREGO, I.; MALDONADO, S.; OTEGUI, M. Seed structure and localization of reserves in *Chenopodium quinoa*. **Annals of Botany**, p. 481-488, 1998.

PRITCHARD, H. W.; SEATON, P. T. Orchids seed storage: Historical perspective current status and future prospects for long-term conservation. **Selbyana**, Sarasota, 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*, p. 92101, 1999.

- RAMOS, M. S. S. **A orquídea e sua reprodução por semente**. São Paulo: Ed. Saraiva, p. 163, 1969.
- RAPOSO, J. G. C. M. F. **A etimologia a serviço dos orquidófilos**. São Paulo: Ave Maria Ltda, 1993.
- RASMUSSEN, H. N. **Terrestrial orchid: from seed to mycotrophic plant**. Cambridge, Cambridge University Press, 1995.
- RIO GRANDE DO SUL. Decreto como espécies da flora nativa ameaçadas de extinção no Estado do Rio Grande do Sul, Decreto n. 52.109, Lex-Diário Oficial do Rio Grande do Sul, ano LXXII, n. 233, p. 2-11, 2014.
- SANTOS, I. R. I. Criopreservação: potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, p. 70-84, 2000.
- SARMENTO, M. B.; VILLELA, F. A. Sementes de espécies florestais nativas do Sul do Brasil. **Informativo Abrates**, v. 20, p. 39-44, 2010.
- SEATON, P. T.; PRITCHARD, H. W. Orchid seed stores for sustainable use: a model for future seed-banking activities. **Lankesteriana**, v. 11, p. 349-353, 2011.
- SERRATO VALENTI, G.; MARIOTTI, M. G.; CORNARA, L.; CORALLO, A. A histological and structural study of *Phacelia tanacetifolia* endosperm in developing, mature, and germinating seed. **International Journal Plant Science**, p. 753-761, 1998.
- SHEEHAN, T. J. Orchids. In: LARSON, R. A. ed. **Introduction to floriculture**. 2. ed. San Diego, Academic Press, p. 13-142, 1992.
- SILVA, E. F. **Multiplicação e crescimento *in vitro* de orquídeas *Brassiactleya Pastoral X Laeliocattleya Amber Glow***. Dissertação. (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras-MG, p. 62-73, 2003.
- SIQUEIRA, C.E de; ZANIN, A; NETO, L.M. Orchidaceae in Santa Catarina: Uptade, geographic distribution and conservation. **Check List** 10(6): 1452–1478, 2014.
- SMITH, S. E.; READ, D. J. **Mycorrhizal symbiosis**. 2. ed. Academic Press, 1997.
- SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira**. Nova Odessa, Instituto Plantarum, 2005.
- STEWART, S. L.; KANE, M. E. Asymbiotic seed germination and in vitro seedling development of *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae), a rare Florida terrestrial orchid. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 86, p. 147-158, 2006.
- SUTTLEWORTH, F. S.; ZIM, H. S.; DILLON, G. W. **Orquídeas: guia dos orquidófilos**. 5. ed., Rio de Janeiro, Expressão e Cultura, p. 158, 1997.

- SUZUKI, R. M. Breve análise sobre o comércio exterior de orquídeas no Brasil. In: 21^a Reunião Anual do Instituto de Botânica. **Anais**. São Paulo: Instituto de Botânica, p. 1-4, 2014.
- THE PLANT LIST (2020) A working list of all plant species. Disponível em: <<http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Orchidaceae/>>. Acesso em: 03 ago. 2020
- TOLEDO, F. F.; MARCOS FILHO, J. **Manual de sementes: tecnologia da produção**. São Paulo: Agronômica Ceres, p. 185-187, 1977.
- TOMBLATO, A. F. C; LUCON, T; MOURA, M.F; BARBOSA, W. Crioconservação de sementes de *Amaryllidaceae*. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 5, p. 77 – 82, 2009.
- TOWILL, L. E. **Cryopreservation of plant germoplasma**. In: TOWILL, L. E.; BAJAJ, Y. P. S. *Cryopreservation of plant germoplasm II*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, p. 4-21, 2002.
- UNEMOTO, L. K.; FARIA, R.T.; VIEIRA, A. O. S.; DALIO, R. J. D. *In vitro* propagation of brazilian orchids on a simplified culture médium. **Revista Brasileira Agrocência**, 13: p. 367269, 2007.
- VALOIS, A. C. C.; NASS, L. L.; GOES, M. de. Conservação *ex situ* de recursos genéticos vegetais. **Recursos genéticos e melhoramento - plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001, p. 123-147, 2001.
- VAN DEN BERG, C. Reaching a compromise between conflicting nuclear and plastid phylogenetic trees: a new classification for the genus *Cattleya* (Epidendreae; Epidendroideae; Orchidaceae). **Phytotaxa** 186: 75-86, 2014.
- VENDRAME, W. A.; FARIA, R. T.; SORACE, M.; SAHYUN, S. A. Review - orchid cryopreservation. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 38, n. 3, p. 213-229, 2014.
- VEYRET, Y. Development of the embryo and young seedlings stages of orchids. In: C.L. Withner (ed). **The orchids: scientific studies**. New York: John Wiley & Sons, p. 223-265, 1974.
- VIEIRA, R. D.; CARVALHO, N. M. **Testes de vigor em sementes**. Jaboticabal: FUNEP, p.164, 1994.
- WESLEY-SMITH, J. et al. Sobrevivência intracelular de gelo e células em eixos embrionários expostos a criogenia de sementes recalcitrantes de *Acer saccharinum*: um estudo ultraestrutural de fatores que afetam as estruturas celulares e de gelo. **Annals of Botany**, v.113, p. 695-709, 2014.
- WITHNER, C. L. *The Cattleyas and Their Relatives*. The *Cattleya*. Timber Press, Portland, Oregon, 194p, 1988.

YEUNG, E.C (2017) A perspective on orchid seed and protocorm development. *Botanical Studies*, v.58, p. 1-14, 2017.

(Artigo submetido na revista Biodiversity and Conservation)

5 CAPÍTULO 1- Desenvolvimento pós seminal e qualidade de sementes de orquídea *Cattleya intermedia* Graham ex Hook. submetidas a diferentes condições de armazenamento

Resumo

Informações sobre o armazenamento de sementes e produção de plântulas de orquídeas da espécie *Cattleya intermedia* são incipientes e necessárias para estabelecer um protocolo eficiente de conservação. Diante disso, os objetivos do presente trabalho foram caracterizar o desenvolvimento pós seminal, avaliar a qualidade das sementes e plântulas originadas a partir destas submetidas a diferentes condições de armazenamento. Os tratamentos consistiram de diferentes temperaturas: 25 (\pm 2°C) (ambiente), -20°C (freezer), -80°C (ultra freezer) e -196°C (criopreservação) e períodos de armazenamento: dois, quatro e seis meses. A qualidade das sementes foi avaliada por testes de tetrazólio e germinação. A qualidade das plântulas foi avaliada a partir de parâmetros morfológicos do desenvolvimento, identificação dos diferentes estádios de desenvolvimento e alterações morfológicas das plântulas obtidas. Os resultados mostraram que a temperatura de -80°C (ultra freezer) é viável e eficaz tanto para a conservação de germoplasma quanto para a retomada do metabolismo das sementes e sua germinação. Foram registrados estádios de desenvolvimento desde a semente até a formação de plântulas normais e observadas alterações morfológicas nas plântulas, como ausência de raiz adventícia e desenvolvimento reduzido, folhas atrofiadas e/ou necrosadas e/ou deformadas, região basal necrosada, raiz adventícia atrofiada e plântula oxidada. Este trabalho é o primeiro relato sobre a qualidade de sementes de *C. intermedia* e das plântulas oriundas de sementes submetidas à diferentes condições de armazenamento e fornece uma base para que mais estudos que envolvam a conservação *ex situ* de diferentes espécies sejam realizados.

Palavras-chave: Conservação *ex situ*. Cultivo *in vitro*. Orchidaceae. Viabilidade de sementes. Vitalidade de sementes.

Abstract

Information on seed storage and seedling production of *Cattleya intermedia* species is incipient and necessary to establish an efficient conservation protocol. Therefore, the objectives of the

present work were to characterize post-seminal development, to evaluate the quality of seeds and seedlings originated from them submitted to different storage conditions. The treatments consisted of different temperatures: 25 (\pm 2°C) (room), -20°C (freezer), -80°C (ultra freezer) and -196°C (cryopreservation) and storage periods: two, four and six months. Seed quality was assessed by tetrazolium and germination tests. Seedling quality was evaluated based on developmental morphological parameters, identification of different developmental stages and morphological changes of the obtained seedlings. The results showed that the temperature of -80°C (ultra freezer) is viable and effective both for the conservation of germplasm and for the resumption of the metabolism of seeds and their germination. Developmental stages from seed to normal seedling formation were recorded and morphological changes were observed in the seedlings, such as absence of adventitious root and reduced development, atrophied and/ or necrotic and/ or deformed leaves, necrotic basal region, atrophied adventitious root and seedling oxidized. This work is the first report on the quality of *C. intermedia* seeds and seedlings from seeds submitted to different storage conditions and provides a basis for further studies involving ex situ conservation of different species.

Key words: *Ex situ* conservation. *In vitro* culture. Orchidaceae. Seed viability. Seed vitality.

5.1 Introdução

A família Orchidaceae é uma das mais numerosas, com espécies ocorrendo em todos os continentes, exceto nas regiões desérticas e na Antártida (Rech et al. 2011). No Brasil, estima-se que existam 252 gêneros e 2.809 espécies, sendo destas 121 do gênero neotropical *Cattleya* Lindl. (Flora do Brasil em construção. 2020).

As orquídeas são consideradas espécies símbolos para a conservação de plantas em todo o mundo, principalmente as do gênero *Cattleya*, que apresentam importância econômica e ecológica nos ecossistemas em que fazem parte (Baillie et al. 2004). Porém, muitas espécies de orquídeas estão desaparecendo dos seus habitats naturais devido a coleta predatória, extrativismo, destruição dos ecossistemas, desaparecimento de polinizadores e às mudanças climáticas (Muller et al. 2007).

Tendo em vista a rápida erosão da diversidade genética quanto à questão da manutenção e a conservação de recursos genéticos, são fundamentais estudos que objetivem o estabelecimento de estratégias que conservem a diversidade de orquídeas a longo prazo

(Machado Neto e Custódio 2005). Entre as estratégias estão as técnicas de cultivo *in vitro* para a produção de mudas em larga escala e a conservação *ex situ* por meio do armazenamento de sementes ou de material vegetal que as represente (Merritt et al. 2014; Araújo et al. 2009; Guerra e Dal Vesco 2010).

Dentre as diferentes técnicas de armazenamento para sementes podem ser citadas aquelas que utilizam condições de baixas temperaturas e umidade. Como exemplo, tem-se o resfriamento em refrigerador e o congelamento em freezer (Engels et al. 2002; Demito e Afonso 2009). Outra técnica muito utilizada para conservar e preservar as sementes é a criopreservação, podendo apresentar benefícios sobre os demais métodos de armazenamento, visto que, o uso da temperatura extremamente baixa inibe o metabolismo celular, preservando o material por período de tempo ilimitado (Pence 2011; Vendrame et al. 2014). A conservação de sementes através do seu armazenamento ainda requer estudos, pois cada espécie tem as suas particularidades (Mayrinck et al. 2016). Com relação à *Cattleya intermedia* Graham ex Hook. estudos sobre o armazenamento de sementes são incipientes.

Associada à forma de armazenar, é importante conhecer a qualidade fisiológica das sementes. A germinação, o vigor e a longevidade são parâmetros fundamentais para caracterizar um bom sistema de conservação e, conseqüentemente, a qualidade das sementes armazenadas. Há várias formas de verificar o vigor e a viabilidade das sementes, sendo utilizados os testes de tetrazólio e o de germinação para avaliação destes parâmetros (Popinigis 1977; Freitas e Nascimento 2006). Magrini et al. (2019) ressaltam a importância dessas avaliações, tanto da viabilidade quanto da germinação, para entender melhor o comportamento das sementes durante o armazenamento.

Outro fator que está diretamente envolvido na qualidade das sementes é o estudo sobre o desenvolvimento das plântulas, visto que, quando as sementes apresentam qualidade favorecem o desenvolvimento, sendo possível a obtenção de plântulas fortes e vigorosas, bem desenvolvidas, que se estabelecem em diferentes condições ambientais (Nakagawa 2015). Além do desenvolvimento das plântulas, é fundamental observar os danos apresentados pelas mesmas, pois, plântulas com alterações morfológicas durante o cultivo *in vitro* possuem baixa capacidade de aclimação interferindo no processo da produção de mudas com qualidade (Seeni e Latha 2000).

A inconsistência das informações científicas a respeito do armazenamento de sementes de orquídea da espécie *C. intermedia*, especialmente em relação a qualidade fisiológica destas

sementes para a produção de plântulas com alta qualidade, gera lacunas no estabelecimento de protocolos para sua conservação. Por isso, os objetivos do presente trabalho foram caracterizar o desenvolvimento pós seminal de *C. intermedia* e avaliar a qualidade das sementes desta espécie submetidas a diferentes condições de armazenamento e a qualidade das plântulas geradas a partir destas sementes.

5.2 Material e Métodos

5.2.1 Material vegetal

Sementes de *C. intermedia* foram cedidas pelo Orquidário Carlos Gomes, situado no Ribeirão da Ilha, Florianópolis- SC ($-27^{\circ}35'48''$ de latitude sul; $-48^{\circ}32'57''$ de longitude oeste, altitude 3 m) no mês de março de 2019. As cápsulas foram coletadas no estágio de maturação e no início da deiscência das mesmas.

Após a coleta, as cápsulas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura média de 25°C ($\pm 2^{\circ}\text{C}$) durante 30 dias, e posteriormente foram analisadas nos Laboratórios do Núcleo de Pesquisas em Biotecnologia e Desenvolvimento Vegetal (NPBV) e no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal (LFDGV), ambos do Departamento de Fitotecnia, localizado no Centro de Ciências Agrárias (CCA) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis-SC.

No laboratório foi realizada a desinfestação superficial das cápsulas em água corrente e posterior imersão em 100 mL de solução comercial de hipoclorito de sódio (Q-Boa®) a 0,4 % (v/v) e detergente neutro (0,5 mL), sob agitação constante durante 20 minutos. O material foi mantido em temperatura ambiente de cerca de 25°C por quatro horas (adaptado de Alvarez-Pardo et al. 2006). Após este período as cápsulas foram abertas, com auxílio de um estilete, para a retirada das sementes que foram submetidas à determinação do teor de umidade inicial e aos diferentes tratamentos de armazenamento à frio.

A determinação do teor de umidade inicial seguiu o método proposto pelo manual de Regras de Análise de Sementes (Brasil 2009). Foram separadas quatro repetições contendo 100 mg de sementes, colocadas em sacos de papel fino e pesadas em balança analítica (Schimadzu AUY220) para determinar a massa fresca, em seguida foram mantidas em estufa (Solab SL100) a temperatura de 105°C por 24 horas para determinar a massa seca. O teor de umidade das sementes foi calculado pela média da diferença entre a massa fresca e a massa seca das

repetições, dividido pela massa seca, e os valores expresso em porcentagem (%) da massa fresca (Bewley & Black, 1994).

5.2.2 Delineamento experimental para o armazenamento de sementes

O delineamento experimental utilizado para o armazenamento das sementes foi o inteiramente casualizado (DIC), num arranjo fatorial 4x3, com doze tratamentos e quatro repetições, totalizando 48 parcelas. Cada unidade experimental foi composta por um microtubo (2 mL), contendo uma amostra de 100 mg de sementes. O regime lúmico utilizado foi o de escuro. Os tratamentos encontram-se descritos na Tabela 1.

Tabela 1 Tratamentos de armazenamento de sementes de *Cattleya intermedia* sob diferentes temperaturas e períodos

Local de armazenamento	Temperatura de armazenamento (°C)	Período de armazenamento (meses)
Sala de crescimento	25 ($\pm 2^{\circ}\text{C}$)	0
Condições ambientais	25 ($\pm 2^{\circ}\text{C}$)	2
Condições ambientais	25 ($\pm 2^{\circ}\text{C}$)	4
Condições ambientais	25 ($\pm 2^{\circ}\text{C}$)	6
Freezer	-20	2
Freezer	-20	4
Freezer	-20	6
Ultra freezer	-80	2
Ultra freezer	-80	4
Ultra freezer	-80	6
Criopreservação	-196	2
Criopreservação	-196	4
Criopreservação	-196	6

5.2.3 Condições para o armazenamento e recuperação pós armazenamento das sementes

Para o armazenamento em condições ambientais 25°C ($\pm 2^{\circ}\text{C}$) as sementes foram acondicionadas em microtubos de plástico (2 mL) vedados (adaptado de Alvarez-Pardo et al. 2006), envoltos em papel alumínio e acondicionados em ambiente desprovido de luz. Nos tratamentos de frio, as sementes foram acondicionadas em microtubos de plástico (2 mL)

vedados e envoltos em papel alumínio. Estes foram acondicionados em caixa de fibra de papelão e armazenados em condições de freezer (-20°C) (Pritchard e Seaton 1993) e ultra freezer (-80°C) (Kulus 2019). Para os tratamentos de criopreservação (-196°C), as sementes foram armazenadas em tubos criogênicos (2 mL) e imersas diretamente em nitrogênio líquido. Para este tratamento foi utilizado um botijão de alumínio e as amostras foram mantidas no fundo do botijão (Nikishina et al. 2001).

Após as sementes serem retiradas dos tratamentos de frio e criopreservação foi realizado um descongelamento rápido do material. As sementes foram mantidas em condições de banho maria, na temperatura de 40°C durante dois minutos, para posteriormente serem submetidas às diferentes avaliações (Santos e Salomão 2010).

5.2.4 Avaliações quantitativas

5.2.4.1 Teste de tetrazólio

Para o teste de tetrazólio foram utilizadas quatro repetições de 2 mg de sementes por tratamento. As sementes foram colocadas em microtubos (2 mL) com a adição de 1,5 mL de concentração da solução de tetrazólio a 1%. Os microtubos foram envoltos em papel alumínio e acondicionados em ambiente desprovido de luz, durante 24 horas à 25°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) (Hosomi et al. 2011). Após esse período, a contagem e identificação das sementes viáveis foi realizada com o auxílio de um microscópio de luz (Olympus® BX-40), a partir de cinco regiões com réplicas de 100 sementes, totalizando 500 sementes avaliadas. Foram consideradas sementes viáveis apenas aquelas com os embriões totalmente corados pelo tetrazólio. O resultado do teste de tetrazólio foi expresso em percentual de sementes viáveis (ISTA 2017).

5.2.4.2 Teste de germinação *in vitro*

Para o teste de germinação foram utilizadas quatro repetições de 5 mg de sementes por tratamento, inclusive um grupo controle sem armazenamento. Estas foram colocadas a germinar em meio de cultura MS, suplementado com sacarose a 30 g/L e solidificado com ágar a 7 g/L (Murashige & Skoog, 1962), o pH ajustado para 5,8, anteriormente a adição de ágar. O meio foi distribuído em frascos de vidro com capacidade para 300 mL, contendo 25 mL de meio em cada frasco e esterilizado em autoclave a 120° C durante 20 minutos. Após o resfriamento do meio de cultura, procedeu-se à sementeira *in vitro* em ambiente asséptico de cabine de fluxo laminar horizontal (Pachane PA-220) (adaptado de Caldas et al. 1998). Antes da sementeira, as

sementes foram desinfestadas por meio de imersão em hipoclorito de sódio 0,4% (v/v), durante cinco minutos e depois lavadas por três vezes, sob agitação constante, em água destilada e esterilizada (adaptado de Alves et al. 2006).

Após esse procedimento as sementes foram depositadas, juntamente com 1 mL de água destilada esterilizada em frascos contendo meio de cultura, que foram envoltos com filme plástico e transferidos para sala de crescimento com temperatura média de 25°C (\pm 2°C), fotoperíodo de 16 horas a uma intensidade luminosa média de 50-60 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (adaptado de Castro e Bach 2007).

Após 45 dias as sementes foram analisadas em microscópio estereoscópico (Olympus SZH10), sendo consideradas germinadas aquelas que apresentaram embriões expandidos e protocormos de coloração verde, de acordo com as definições de Seaton e Hailes (1989). O percentual de germinação foi obtido a partir da fórmula a seguir e expressa em percentual de sementes germinadas.

$$\% \text{ de germinação} = (\text{N}^\circ \text{SEC} \times 100) \div (\text{N}^\circ \text{TS})$$

Onde:

Nº SEC: número de sementes com embriões clorofilados;

Nº TS: número total de sementes.

5.2.5 Avaliação de crescimento e desenvolvimento pós seminal *in vitro*

As avaliações de desenvolvimento foram realizadas com material vegetal de *C. intermedia* oriundos dos testes de germinação *in vitro* das sementes, dos diferentes tratamentos de armazenamento (diferentes temperaturas) após dois meses. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com cinco repetições por tratamento. Cada repetição foi composta por cinco tubos de ensaio contendo meio de cultura MS suplementado com sacarose a 30 g/L e solidificado com ágar a 7 g/L (Murashige & Skoog, 1962), o pH ajustado para 5,8, anteriormente a adição de ágar e amostras de material vegetal.

Para avaliação dos estádios de desenvolvimento pós seminal foi seguida a metodologia de Arditti (1967) e Stewart e Zettler (2002).

Para as análises dos parâmetros morfológicos e das possíveis alterações oriundas dos diferentes tratamentos de temperatura, foram selecionadas plântulas com aproximadamente 0,5 cm de altura, apresentando um par de folhas. As raízes adventícias foram cortadas e as plântulas transferidas para tubos de ensaio, em ambiente asséptico de cabine de fluxo laminar horizontal

(Pachane PA-220). Após a repicagem, o material foi transferido para sala de crescimento com temperatura média de 25°C ($\pm 2^\circ\text{C}$), fotoperíodo de 16 horas a uma intensidade luminosa média de 50-60 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, durante 60 dias. Foram avaliados os seguintes parâmetros: porcentagem de sobrevivência (%), altura das plântulas e comprimento da maior raiz (cm), com a utilização de régua graduada, número de folhas por plântula, número de raízes por plântula e a massa fresca das plântulas (mg), com o auxílio de uma balança analítica (Suzuki et al. 2010). Para a avaliação de alterações morfológicas das plântulas, foi utilizada metodologia conforme as Regras para Análise de Sementes (Brasil 2009).

5.2.6 Análise estatística

Os dados das análises de tetrazólio, germinação de sementes e parâmetros morfológicos das plântulas foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa estatístico SISVAR 5.1 (Ferreira 2008). Também foi utilizada a análise de regressão polinomial a fim de verificar o comportamento das variáveis em função do período de armazenamento. Foram determinadas as raízes de cada equação ajustada com o objetivo de determinar quando as sementes perdiam totalmente a sua viabilidade e capacidade germinativa.

5.3 Resultados

5.3.1 Caracterização do desenvolvimento pós seminal

Os estádios de desenvolvimento observados durante a germinação *in vitro* de sementes não submetidas ao armazenamento, estão descritos na Tabela 2 e podem ser visualizados na Figura 1.

Tabela 2 Estádios de desenvolvimento, dias após a sementeira (DAS) e características das estruturas de sementes e plântulas de *Cattleya intermedia*, durante a germinação *in vitro*, à temperatura ambiente de 25 (\pm 2°C) (adaptado de Arditti 1967 e Stewart e Zettler 2002)

Estádio de desenvolvimento	Tempo (DAS)	Característica
0	0	Sementes com o embrião intacto (viáveis) e sementes sem embrião (inviáveis).
1	21	Embrião intumescido (inchado e verde) dando início ao processo germinativo.
2	30	Protocormo tuberiforme.
3	50	Estabelecimento do protocormo com formação de protuberância foliar e a presença de rizoides.
4	-	Protocormo apresentando uma folha.
5	100	Surgimento das primeiras folhas, primórdios das raízes adventícias e início da formação da plântula normal.
6	180	Plântula normal apresentando duas ou mais folhas e presença da raiz adventícia.

Na figura 1 são apresentadas as fases de desenvolvimento pós seminal de *C. intermedia*, cultivada *in vitro*, desde a semente até a formação da plântula, em dias após a semeadura (DAS). O estágio zero (Fig. 1A) foi constituído pelas sementes com embriões viáveis (marcados pelo tetrazólio) e as sementes sem a presença do embrião. Foi possível observar, aos 21 DAS (Fig. 1B), a presença de embriões em início de germinação, intumescidos e clorofilados, constituindo o estágio 1 de desenvolvimento. O estágio 2 (Fig. 1C), mostrou a formação dos protocormos tuberiformes precoces, aos 30 DAS. No estágio 3 (50 DAS) os protocormos mostraram ápice vegetativo (protuberância foliar) e a formação dos rizoides (Fig. 1D e 1E). O estágio 5 foi atingido aos 100 DAS, com a formação das primeiras folhas e primórdios foliares, região basal e o início da formação das raízes adventícias (Fig. 1F). Aos 180 DAS as plântulas atingiram o estágio 6 (Fig. 1G e 1H), apresentando folhas, região basal bem visível e raízes adventícias bem desenvolvidas.

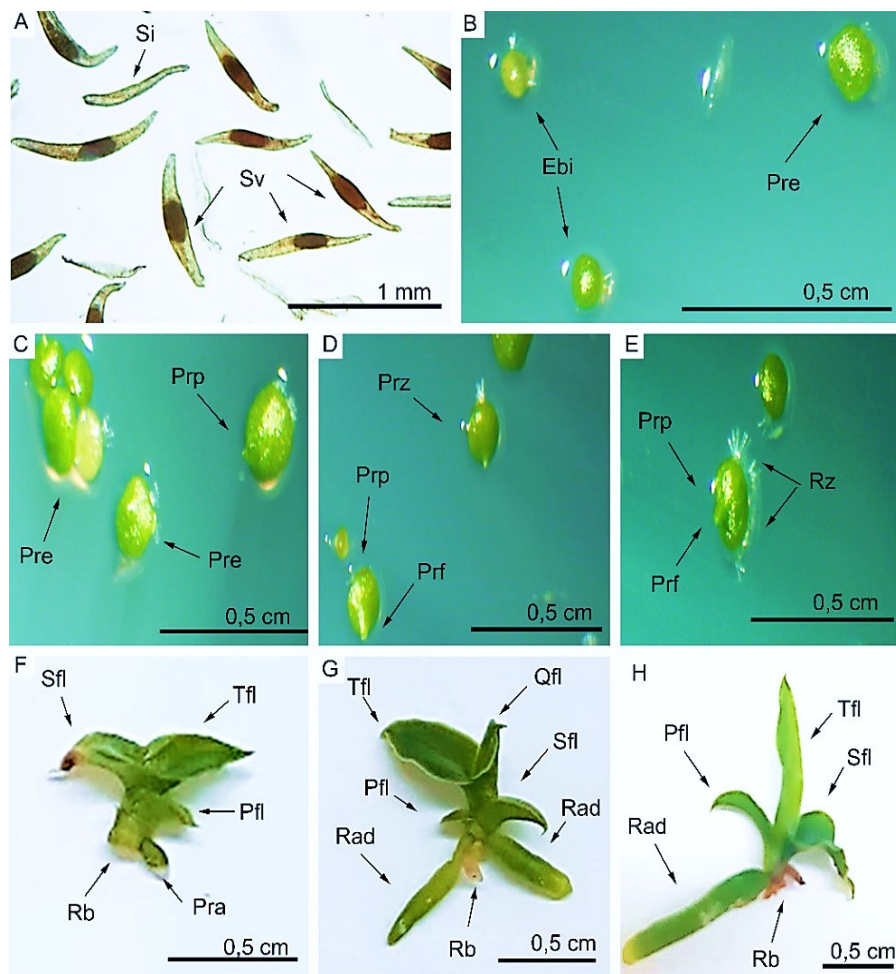


Figura 1 Desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya intermedia*, até 180 dias após a semeadura. **A.** Estádio 0- Sementes não viáveis (sem embrião) e viáveis (embriões visíveis e marcados pelo tetrazólio). **B.** Estádio 1- Início da germinação das sementes (embriões intumescidos e clorofilados). **C.** Estádio 2- Protocormos esféricos. **D. E.**

Estádio 3- Protocormos mostrando ápice vegetativo (primórdio do folíolo) e rizoides. **F.** Estádio 5- Plântula normal com primeiras folhas e primórdio da raiz. **G. H** Estádio 6- Plântula normal com folhas e raiz adventícia. Ebi, embrião intumescido; Pfl, primeira folha; Pra, primórdio da raiz; Pre, protocormo esférico em início de germinação; Prf, protuberância foliar; Prz, protocormo com rizoides; Qfl, quarta folha; Rad, raiz adventícia; Rb, região basal; Rz, rizoides; Sfl, segunda folha; Si, sementes inviáveis; Sv, sementes viáveis; Tfl, terceira folha. Barra de escala: **A** – 1 mm; **B, C, D, E, F, G, H**- 0,5 cm

5.3.2 Teste de tetrazólio

Os dados apresentados na Tabela 3 e na Figura 2 se referem à viabilidade das sementes de *C. intermedia*, submetidas ao teste de tetrazólio. As sementes recém coletadas e não submetidas ao armazenamento apresentaram viabilidade inicial de 64%. Foi observada interação entre as temperaturas e períodos de armazenamento, porém durante os diferentes tratamentos de armazenamento houve perda da viabilidade das sementes.

Tabela 3 Percentual de viabilidade de sementes de *Cattleya intermedia* submetidas ao teste de tetrazólio após diferentes temperaturas e períodos de armazenamento

Tratamentos	2 meses	4 meses	6 meses
25 ($\pm 2^{\circ}\text{C}$)	45,4 bA	28,7 cB	16,4 cC
-20 $^{\circ}\text{C}$	48,6 bA	40,3 bB	38,8 bB
-80 $^{\circ}\text{C}$	58,1 aA	49,9 aA	45,6 aB
-196 $^{\circ}\text{C}$	57,0 aA	47,5 abB	43,9 aB
CV (%)	5,11%	9,11%	5,21%

Letras diferentes minúsculas na coluna indicam diferença estatística significativa entre as temperaturas de armazenamento. Letras diferentes maiúsculas na linha indicam diferença estatística significativa entre os períodos de armazenamento. Teste Tukey a 5% de probabilidade.

O teste de tetrazólio mostrou que sementes armazenadas durante dois meses apresentaram viabilidade de 58,1% (-80 $^{\circ}\text{C}$) e 57,0% (-196 $^{\circ}\text{C}$), sem diferença estatística entre estes valores e a viabilidade das sementes recém beneficiadas (64%). Porém, após quatro meses de armazenamento, somente a temperatura de -80 $^{\circ}\text{C}$ manteve a viabilidade em 49,9%, sem diferença estatística significativa em relação ao armazenamento durante dois meses. Para as demais temperaturas, o armazenamento durante quatro meses mostrou decréscimo significativo da viabilidade. Por sua vez, sementes armazenadas por seis meses mostraram perda significativa de viabilidade em todas as temperaturas testadas, sendo a menor observada em 25 ($\pm 2^{\circ}\text{C}$) (16,4%) (Tabela 3).

A equação de regressão obtida para as diferentes temperaturas de armazenamento de sementes de *C. intermedia* previu a redução da viabilidade das mesmas ao longo do tempo. Pode-se perceber que a diminuição do percentual de viabilidade apresentou maior declínio quando as sementes foram mantidas em temperatura de 25 ($\pm 2^\circ\text{C}$). Nas condições de armazenamento à frio (-20°C , -80°C e -196°C) a queda da viabilidade foi menor (Figura 2). As equações demonstraram ainda que as sementes perderiam totalmente a viabilidade após 7,8 meses ($25 (\pm 2^\circ\text{C})$); 14,4 meses (-20°C); 18,2 meses (-196°C); 20,1 meses (-80°C).

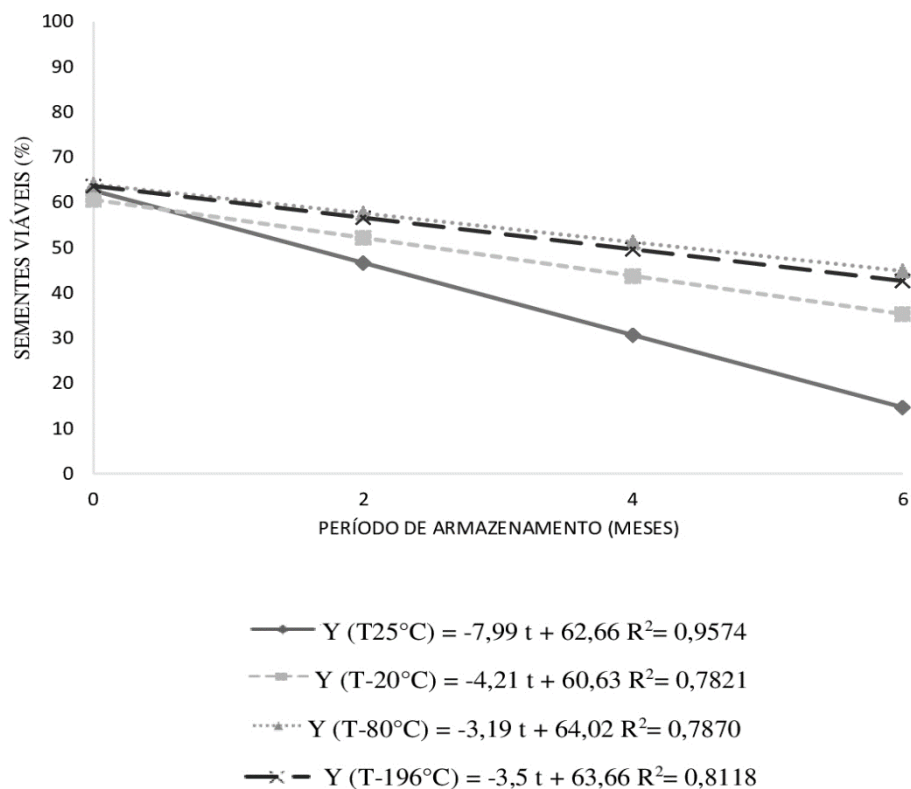


Figura 2 Equações de regressão da viabilidade das sementes (%) de *Cattleya intermedia* submetidas a diferentes temperaturas ($^\circ\text{C}$) e períodos de armazenamento (meses).

5.3.3 Teste de germinação

Os dados apresentados na Tabela 4 e na Figura 3 se referem ao percentual de germinação das sementes de *C. intermedia*, submetidas ao teste de germinação. As sementes recém coletadas e não submetidas ao armazenamento, apresentaram germinação de 76%. Foi observada interação entre as temperaturas e períodos de armazenamento. Depois de submetidas

aos diferentes tratamentos de armazenamento, foi possível observar que houve perda na capacidade de germinação das sementes.

Tabela 4 Percentual de germinação de sementes de *Cattleya intermedia* submetidas a diferentes temperaturas e períodos de armazenamento

Tratamentos	2 meses	4 meses	6 meses
25 ($\pm 2^{\circ}\text{C}$)	26,9 cA	11,8 cB	0 bC
-20 $^{\circ}\text{C}$	55,9 bA	51,6 bA	50,4 aA
-80 $^{\circ}\text{C}$	71,9 aA	67,4 aA	48,7 aB
-196 $^{\circ}\text{C}$	62,9 abA	58,8 bA	45,9 aB
CV (%)	9,52%	8,37%	9,07%

Letras diferentes minúsculas na coluna indicam diferença estatística significativa entre as temperaturas de armazenamento. Letras diferentes maiúsculas na linha indicam diferença estatística significativa entre os períodos de armazenamento. Teste Tukey a 5% de probabilidade.

Observou-se pelo teste de germinação que até dois meses de armazenamento, as sementes mantidas em -80 $^{\circ}\text{C}$ mantiveram a capacidade germinativa (71,9%) sem diferença significativa quando comparadas às sementes recém beneficiadas (76%). Nas demais temperaturas houve redução significativa desta capacidade, sendo o menor percentual de germinação obtido em sementes mantidas a 25 ($\pm 2^{\circ}\text{C}$) (26,9%). Após quatro meses de armazenamento, as sementes apresentaram percentuais de germinação de 67,4% (-80 $^{\circ}\text{C}$), 58,8% (-196 $^{\circ}\text{C}$) e 51,6% (-20 $^{\circ}\text{C}$), sem diferenças significativas entre elas em comparação ao armazenamento por dois meses, nas mesmas condições. Novamente a temperatura de 25 ($\pm 2^{\circ}\text{C}$) apresentou redução significativa da germinação (11,8%) em relação aos demais tratamentos. Ao final de seis meses, somente as sementes mantidas à -20 $^{\circ}\text{C}$ não apresentaram alteração das taxas de germinação (50,4%) quando comparado aos outros períodos de armazenamento. Nas temperaturas de -80 $^{\circ}\text{C}$ (48,7%) e -196 $^{\circ}\text{C}$ (45,9%), os percentuais de germinação não foram estatisticamente diferentes de -20 $^{\circ}\text{C}$, mas diferiram em relação aos demais períodos de armazenamento. Sementes mantidas a 25 ($\pm 2^{\circ}\text{C}$) não germinaram (0%) após 6 meses de armazenamento, diferindo significativamente dos demais tratamentos (Tabela 4).

Na Figura 3 estão expressas as equações de regressão do percentual de germinação nos diferentes tratamentos de armazenamento das sementes de *C. intermedia*. Pode-se observar que as sementes armazenadas à 25 ($\pm 2^{\circ}\text{C}$) apresentaram uma queda acentuada na capacidade

germinativa, perdendo por completo esta capacidade após cinco meses. Nos tratamentos de armazenamento em condições de frio (-20°C, -80°C e -196°C) foi observado que a perda da capacidade de germinação foi menor. As equações demonstraram que as sementes perderiam totalmente a capacidade germinativa em 5 meses (25(± 2°C)); 15,9 meses (-196°C); 17,5 meses (-20°C); 18,3 meses (-80°C).

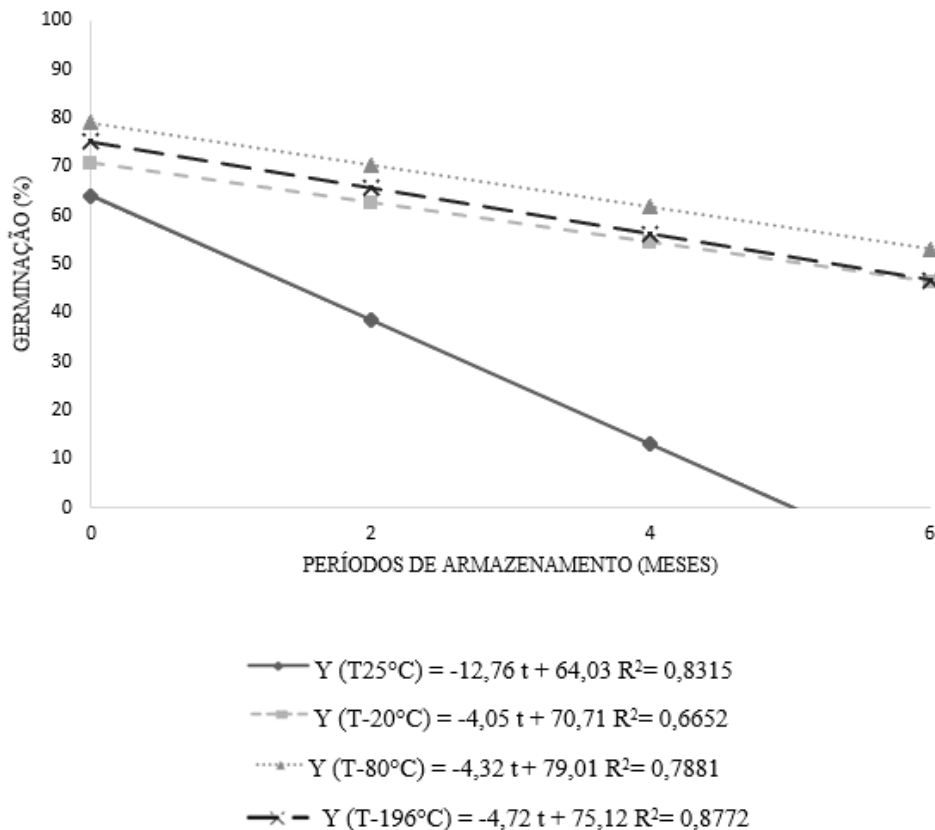


Figura 3 Equações de regressão da germinação (%) de sementes de *Cattleya intermedia* submetidas a diferentes temperaturas (°C) e períodos de armazenamento (meses).

5.3.4 Análise do crescimento e desenvolvimento de plântulas

Os resultados, referentes ao crescimento de plântulas de *C. intermedia*, provenientes dos diferentes tratamentos de armazenamento de sementes, encontram-se descritos na Tabela 5.

Tabela 5 Porcentagem de sobrevivência (PS), altura das plântulas (AP), comprimento da maior raiz (CR), número de raízes (NR), número de folhas (NL) e a massa fresca das plântulas (MF) provenientes de sementes de *Cattleya intermedia* submetidas à diferentes temperaturas e períodos de armazenamento com retomada do desenvolvimento em cultivo *in vitro* após 60 dias.

Tratamentos	PS (%)	AP (cm)	CR (cm)	NR	NF	MF (mg)
25 ($\pm 2^\circ\text{C}$)	92 a	1,00 a	0,70 a	1,00 b	3,00 b	30,6 a
-20°C	92 a	1,06 a	0,60 ab	1,00 b	4,00 ab	40,6 a
-80°C	88 a	0,80 a	0,50 ab	2,00 a	5,00 a	40,4 a
-196°C	76 a	0,70 a	0,40 b	1,00 b	4,00 ab	44,4 a
CV (%)	20,24	29,81	29,55	26,97	27,20	35,56

Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste Tukey (nível de significância de 5%).

Dentre os parâmetros morfológicos analisados nas plântulas, somente o comprimento de raízes (cm) e o número de raízes e folhas apresentaram diferenças estatísticas significativas entre as temperaturas testadas.

O maior comprimento de raiz foi observado à 25 ($\pm 2^\circ\text{C}$) (0,70) e o menor à -196°C (0,40). Em relação ao número de raízes por plântula, na temperatura de -80°C foi observado em média 2 raízes, enquanto nos demais tratamentos a média foi significativamente menor (1,00). O número de folhas por plântula foi significativamente maior na temperatura de -80°C (5,00), enquanto o menor número foi observado na temperatura de 25 ($\pm 2^\circ\text{C}$) (3,00) (Tabela 5).

Dentre os parâmetros que não apresentaram diferenças estatísticas significativas entre as temperaturas de armazenamento, a porcentagem de sobrevivência (%) variou de 76 (-196°C) a 92 (25°C e -20°C), a altura das plântulas (cm) variou de 0,70 (-196°C) a 1,06 (-20°C), e a massa fresca (mg) variou de 30,6 (25 ($\pm 2^\circ\text{C}$)) a 44,4 (-196°C).

5.3.5 Alterações morfológicas oriundas do armazenamento

Na Figura 4 podem ser visualizadas plântulas de *C. intermedia* com desenvolvimento normal e plântulas com alterações morfológicas oriundas de sementes submetidas a diferentes temperaturas de armazenamento após dois meses.

Foram consideradas plântulas normais as que apresentaram folhas, raízes adventícias e regiões basais bem desenvolvidas (Fig. 4A, C, F, J).

Dentre as anormalidades detectadas podem ser citadas plântulas sem raiz adventícia e com desenvolvimento reduzido (4B), sem as raízes, com primórdios foliares atrofiados e/ou necrosados e/ou deformados, região basal necrosada e desenvolvimento reduzido (4D, G, L,

M). Também foram registradas plântulas com folhas necrosadas e pouco desenvolvidas, raízes adventícias atrofiadas e desenvolvimento reduzido (4E, H, I), plântulas com raízes atrofiadas e plântulas totalmente oxidadas (4K, N).

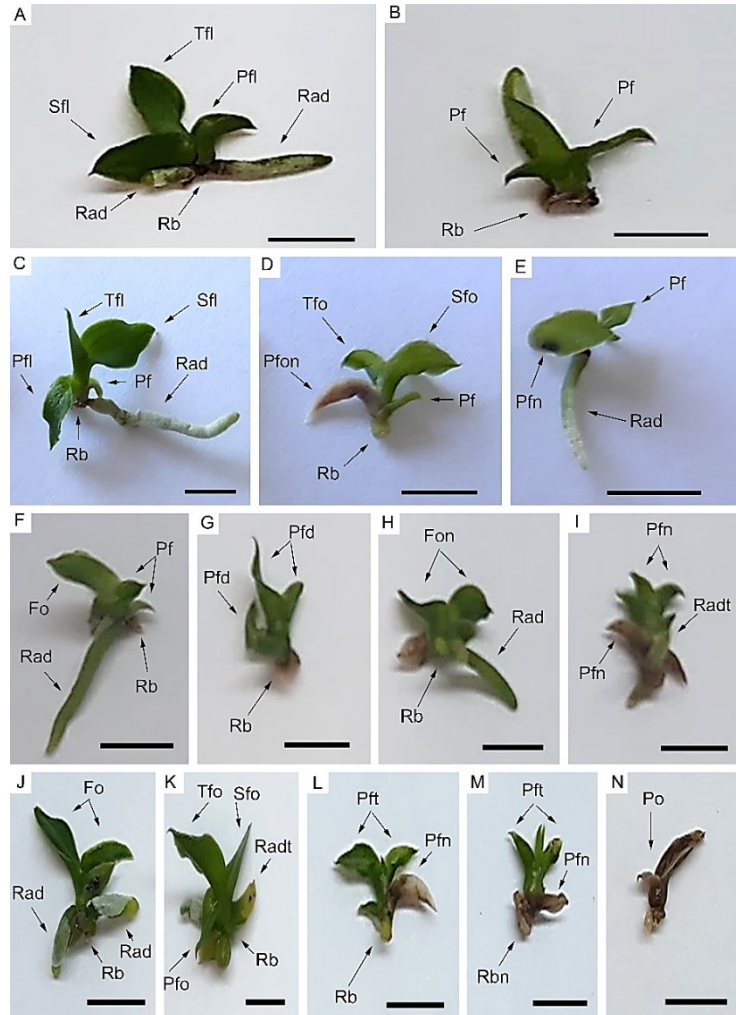


Figura 4 Morfologia do desenvolvimento de plântulas de *Cattleya intermedia*, provenientes de sementes armazenadas sob diferentes temperaturas durante dois meses. **A.B. Armazenamento à 25 (± 2°C)**: em A, plântula normal, apresentando folíolos, raízes adventícias e região basal bem desenvolvidos. Em B, plântula anormal, com tamanho reduzido, sem a raiz adventícia. **C.D.E. Armazenamento à -20°C**: em C, plântula normal, com estruturas vegetativas bem desenvolvidas. Em D, plântula anormal, sem raiz adventícia, com primórdio foliar necrosado e tamanho reduzido. Em E, plântula anormal, com primórdio foliar necrosado e tamanho reduzido. **F.G.H.I. Armazenamento à -80°C**: Em F, plântula normal, sem ausência de estruturas vegetativas. Em G, plântula anormal, sem a presença da raiz adventícia, com primórdios foliares deformados e tamanho reduzido. Em H, plântula anormal, com a presença de folíolo necrosado. Em I, plântula anormal, com primórdio foliar necrosado, presença de raiz adventícia atrofiada e tamanho reduzido. **J.K.L.M.N. Armazenamento à -196°C**: Em J, plântula normal. Em K, plântula anormal, com a presença de raiz adventícia atrofiada. Em L, plântula anormal, sem a presença de raiz adventícia, tamanho reduzido e com primórdios foliares atrofiados e necrosados. Em M, plântula anormal, sem a presença da raiz adventícia, primórdios foliares atrofiados e necrosado e região basal necrosada e

tamanho reduzido. Em N, plântula totalmente oxidada. Fo, folha; Fon, folha necrosada; Pdf, primórdio foliar deformado; Pf, primórdio foliar; Pfl, primeira folha; Pft, primórdio foliar atrofiado, Pfn, primórdio foliar com necrose ou necrosado, Pfon, primórdio foliar oxidado; Po, plântula oxidada; Rad, raiz adventícia; Radt, raiz adventícia atrofiada; Rb, região basal, Rbn, região basal necrosada; Sfl, segunda folha; Sfo, segundo folíolo; Tfl, terceira folha; Tfo, terceiro folíolo. Barra de escala: 0,5 cm

5.4 Discussão

5.4.1 Estádios de desenvolvimento de *Cattleya intermedia*

Sementes da orquídea *C. intermedia* são diminutas e consideradas ortodoxas (Pritchard et al. 1999). Possuem um embrião localizado no centro da semente. Quando este se apresenta viável, contém as reservas nutricionais, que são consideradas mínimas e cuja principal função é promover a germinação (Harrison 1977). Estas sementes são dependentes da simbiose com fungos, indispensáveis durante a germinação destas sementes na natureza (Dearnaley 2007). Por isso, estudos sobre o uso de meio de cultura para facilitar o processo germinativo dessas sementes *in vitro* são amplamente realizados a fim de obter mudas em larga escala, em menor tempo e com melhor qualidade (Silva et al. 2017; Abrão et al. 2014; Ferreira et al. 2017; Juras et al. 2019). No caso deste trabalho, o meio MS se mostrou eficaz para os registros de desenvolvimento propostos.

Geralmente o processo de germinação das sementes de orquídeas durante o cultivo *in vitro* se inicia através do intumescimento da semente, com o rompimento da estrutura do tegumento, devido ao aumento do tamanho das estruturas, com a formação de uma pequena estrutura clorofilada denominada de protocormo (Arditti 1967, 1992). O protocormo representa uma transição entre a fase do embrião e o início do desenvolvimento dos primeiros primórdios do sistema caulinar e radicular (Leroux 1997; Pridgeon et al. 2005). Este segundo estágio de desenvolvimento foi alcançado aos 30 DAS para *C. intermedia*.

Após alguns dias do início do desenvolvimento do protocormo, desenvolve-se o ápice vegetativo que é responsável pela formação do primórdio foliar. Na parte basal do protocormo se inicia a formação dos rizoides, cuja principal função é a fixação do protocormo e a absorção de nutrientes do meio (Kraus et al. 2006; Cribb 1999). Este terceiro estágio foi registrado aos 50 DAS para esta espécie. O quarto estágio é caracterizado pela formação da primeira folha no protocormo, para a espécie *C. intermedia* não foi possível obter o registro deste quarto estágio de desenvolvimento. O estágio de protocormo apresenta término quando se tem a presença dos meristemas apicais, primórdios foliares e das raízes, a partir desse momento esse estágio passa

a ser denominado como plântula (Yeung 2017). Este quinto estágio foi alcançado aos 100 DAS. A fase de plântula é caracterizada por ser um processo lento, uma vez que a mesma precisa desenvolver por completo as suas folhas e raízes adventícias para caracterizar-se como uma plântula normal (Gutierre 2001). O estágio de plântula normal foi registrado aos 180 DAS. O registro do desenvolvimento de *C. intermedia* está em conformidade com os trabalhos de Galdiano Júnior et al. 2013 que estudaram o desenvolvimento inicial e o crescimento *in vitro* da espécie *Cattleya violaceae*, bem como de Utami et al. (2019) que abordaram a germinação e o desenvolvimento *in vitro* de mudas de orquídea da espécie *Phalaenopsis amboinensis* e também de Suzuki et al. 2012 que retrataram o desenvolvimento *in vitro* de plântulas da espécie *Hoffmannseggella cinnabarina*.

A compreensão dos estágios de desenvolvimento das plântulas e as suas mudanças morfológicas, registradas em DAS, se faz importante para a compreensão das mudanças que ocorrem durante o processo germinativo e o quanto estas mudanças demoram a serem efetivadas. Essa caracterização da morfologia inicial das plântulas permite o melhor entendimento do processo do desenvolvimento para a produção de mudas, como também informações importantes que sirvam como base para o conhecimento da conservação das espécies, ainda mais aquelas que requerem um longo tempo para completar cada estágio, como no caso das orquídeas (Guerra et al. 2006; Santos et al. 2005). Para essa espécie, foi possível determinar que, após 180 DAS já havia plântulas que poderiam ser classificadas como novos indivíduos capazes de suportar a aclimação ao ambiente natural. Além disso, a caracterização da morfologia normal das plântulas permitiu a identificação de anormalidades oriundas do armazenamento.

5.4.2 Viabilidade e capacidade germinativa de sementes armazenadas

Os testes de tetrazólio e de germinação demonstraram redução significativa da viabilidade e da capacidade germinativa das sementes de *C. intermedia* armazenadas, quando comparadas com a viabilidade de 64% e a capacidade de germinação de 76% das sementes recém beneficiadas.

Os menores percentuais de germinação foram verificados na temperatura de 25 ($\pm 2^\circ\text{C}$) (temperatura ambiente), cujas sementes apresentaram redução da viabilidade de 45,4% aos 2 meses de armazenamento, para 16,4% ao final de seis meses. Em relação à germinação, foi de 26,9% aos dois meses de armazenamento para 0% aos seis meses, ou seja, perda completa da

capacidade germinativa, resultados que foram menores aos obtidos no teste de tetrazólio. As equações demonstraram que, após sete meses de armazenamento, haveria redução da viabilidade até perder completamente a capacidade germinativa a partir do quinto mês. Estes resultados foram comprovados pelo teste de germinação. Marcos Filho (2015) afirma que o processo de perda da viabilidade em sementes é um dos últimos fatores atingidos pelo processo de deterioração. Antes da perda completa de viabilidade, ocorre a degradação das membranas celulares, a redução da atividade respiratória, a germinação lenta e desuniforme, a perda completa do poder germinativo e, finalmente, a morte das sementes. Isso pode explicar a diferença nos resultados obtidos pelo teste de tetrazólio e de germinação para esta espécie.

Diengdoh et al. (2017), ao estudarem o armazenamento de sementes de *Paphiopedilum insigne* observaram que o armazenamento à 25°C reduziu a capacidade de germinação das mesmas. Estes autores sugerem que, em temperaturas mais elevadas, as sementes sofram com estresse excessivo por desidratação, o que acaba comprometendo a sua viabilidade e qualidade. As sementes de *C. intermedia* foram armazenadas com umidade inicial acima de 30%. De acordo com Marcos Filho (2015) sementes armazenadas com elevados teores de umidade sofrem com a redução gradativa da qualidade fisiológica, uma vez que o processo da perda da viabilidade e vigor ocorre de forma mais rápida em condições de temperatura ambiente. Ainda, segundo Mello (2000) e Silva et al. (2001) este fato pode estar relacionado a diversos fatores, como o aumento da atividade metabólica, acúmulo de substâncias inibidoras, envelhecimento natural e o processo de deterioração. Por consequência das condições ambientais adversas e o alto teor de umidade das sementes durante o armazenamento ocorre uma aceleração do processo de deterioração, isto resulta na redução da viabilidade, na perda completa do poder germinativo e na produção de plântulas menores (Bewley e Black 1994; Pádua 1998). Tais ocorrências foram constatadas neste trabalho para as sementes de *C. intermedia* mantidas a 25 ($\pm 2^\circ\text{C}$).

Quanto aos resultados para sementes armazenadas à frio, a temperatura de -80°C (em ultrafreezer), durante quatro meses, foi a que melhor manteve as taxas de viabilidade (49,9%) e de germinação (67,4%), embora significativamente menores que as das sementes recém beneficiadas. Para esta mesma temperatura, sementes armazenadas por seis meses tiveram redução significativa da viabilidade (45,6%) e da germinação (48,7%). As equações previram a manutenção da viabilidade e da capacidade germinativa das sementes armazenadas nesta temperatura por cerca de 18 meses. Kauth et al. (2008) verificaram que alterações nas respostas germinativas das sementes estão comumente ligadas à perda da viabilidade e da qualidade das

mesmas. Estas perdas podem ser reduzidas a partir do momento em que as sementes são acondicionadas em condições de frio (Bewley et al. 2013; Rasmussen 1995), isto porque, as baixas temperaturas promovem a redução do processo metabólico das sementes proporcionando melhores condições para a preservação da sua qualidade fisiológica durante o período em que estas se encontram armazenadas (Menezes e Villela 2009; Carvalho e Nakagama 2012). Franceschi et al. (2019) encontraram resultados semelhantes ao estudar sementes de *Grandiphyllum divaricatum*, *Gomesa praetexta* e *G. recurva* quando armazenadas na temperatura de -80°C , durante doze meses. Esses resultados indicam que essa temperatura de armazenamento pode ser utilizada para armazenar as sementes da maioria das espécies de orquídeas em banco de sementes, incluindo as sementes de *C. intermedia*.

Com relação às sementes armazenadas a -196°C (criopreservadas), os resultados obtidos indicam que o armazenamento manteve taxas de viabilidade (57,0%) sem diferença significativa para as que foram armazenadas à -80°C (58,1%) somente até dois meses de armazenamento. Em relação à germinação, as taxas apresentaram diferenças significativas após dois meses de armazenamento das sementes (62,9%). Cerna et al. (2018) ao estudarem métodos de criopreservação de sementes de *Epidendrum quitensium*, *E. anderssonii* e *Sobralia rosea*, observaram que, quando estas foram mantidas em temperatura de -196°C , via congelamento rápido, responderam melhor quanto à viabilidade das sementes. Isso se deve ao fato de que durante o congelamento em nitrogênio líquido os processos bioquímicos das sementes são paralisados, prolongando a sua conservação por longo período (Pritchard 1984; Benson 1999). Ainda para as sementes de *C. intermedia* foi observado que as sementes criopreservadas apresentaram redução da sua longevidade ao longo do período em que permaneceram armazenadas, contrariando o que foi visto na literatura de que o material vegetal criopreservado pode ser armazenado por um período de tempo indeterminado, sem comprometer a sua qualidade (Vendrame et al. 2014).

Fiona et al. (2010), ao estudarem o comportamento germinativo de sementes de *Pterostylis recurva*, verificaram que as mesmas apresentaram menor perda da capacidade germinativa quando armazenadas em temperatura de -80°C , em relação às sementes que foram armazenadas na temperatura de -196°C . Resultados semelhantes aos destes autores foram encontrados neste trabalho, no qual as sementes de *C. intermedia* criopreservadas apresentaram menor capacidade de germinação em relação às sementes mantidas em temperatura de -80°C devido à elevada umidade em que foram armazenadas (30%). Burke et al. 1976 sugerem que a

umidade elevada é um dos fatores mais críticos durante a etapa da criopreservação, sendo que as sementes podem sofrer redução da sua longevidade. Além disso, o rápido declínio da temperatura pode resultar em um super resfriamento da solução aquosa, causando a formação de gelo intracelular, como também a ocorrência de distúrbios nas células e tecidos que podem ser letais para as sementes (Guy 2003). Em conformidade a estes autores, seria importante estudar a técnica de criopreservação das sementes desidratadas de *C. intermedia*, de modo a evitar os danos do congelamento verificado nestas sementes com 30% de umidade.

Cabe ressaltar que foram encontradas diferenças significativas entre os resultados do teste de tetrazólio e de germinação das sementes de *C. intermedia* nos vários tratamentos e períodos de armazenamento. Segundo Dutra e Medeiros Filho (2008), vários estudos têm questionado o uso do teste de tetrazólio como o único parâmetro para indicar a qualidade das sementes, devendo ser utilizadas as duas técnicas concomitantemente, uma vez que apresentam maior segurança na confirmação dos resultados, conforme também constatado neste trabalho.

5.4.3 Morfologia do desenvolvimento das plântulas oriundas de sementes armazenadas

Os parâmetros morfológicos analisados nas plântulas oriundas de sementes armazenadas à -80°C , não mostraram diferenças significativas em relação às demais temperaturas, exceto em relação ao número de raízes e folhas por plântula, com resultados significativamente maiores. Os resultados dos testes de tetrazólio e de germinação também apontaram a temperatura de -80°C como a que melhor preservou a qualidade das sementes armazenadas, corroborando com a afirmação de Nakagawa (2015) de que sementes com maior vigor têm a capacidade de produzir plântulas mais bem desenvolvidas.

Segundo, Fernandes et al. (2019), a avaliação de caracteres morfológicos de plântulas provenientes do cultivo *in vitro*, de sementes armazenadas em diferentes condições de temperatura, é essencial para obter respostas referentes ao seu desenvolvimento e consequentemente, verificar o estado qualitativo das sementes. Durante o armazenamento, os parâmetros que envolvem a qualidade das sementes são diretamente afetados e consequentemente influenciam o desenvolvimento das plântulas. Sementes com alto vigor proporcionam maior velocidade durante os processos metabólicos, formando plântulas com maior crescimento e desenvolvimento (Schuch et al. 1999).

De acordo com Tombolato (2002), as plântulas provenientes do cultivo *in vitro* devem se apresentar com aspecto sadio, sistema radicular e parte aérea bem formados e desenvolvidos,

a fim de garantir plântulas com melhor qualidade para o uso na exploração comercial, recuperação de áreas degradadas, estabelecimento de bancos de germoplasma e nos programas de melhoramento (Melo et al. 1998).

5.4.4 Alterações morfológicas em plântulas oriundas de sementes armazenadas

Após dois meses de armazenamento, as sementes oriundas de todas as temperaturas de armazenamento testadas originaram plântulas consideradas anormais, com ausência de estruturas vegetativas, tamanho reduzido das estruturas e das plântulas, ocorrência de necrose ou oxidação de partes de suas estruturas vegetativas. Segundo Lopes e Souza (2015), observações relacionadas às alterações morfológicas no desenvolvimento das plântulas podem fornecer informações de suma importância que servem como subsídios para a produção de mudas de alta qualidade, além de permitir uma melhor compreensão do processo que envolve o estabelecimento vegetativo da espécie.

De acordo com Chinnusamy et al. (2007), as condições de armazenamento também podem influenciar em questões relacionadas a estes parâmetros, uma vez que as baixas temperaturas podem impedir que a planta expresse o seu potencial genético, por conta da inibição das reações metabólicas, que foram causadas pela desidratação celular induzida durante a etapa de congelamento das sementes. Ruelland e Zachowski (2010) afirmam que a exposição de materiais nas baixas temperaturas pode alterar funções celulares, fisiológicas e bioquímicas, e como consequência dessas alterações é possível observar, no decorrer no desenvolvimento das plântulas, sintomas visíveis, como o aparecimento de necroses ou atrasos no desenvolvimento de algumas estruturas que são essenciais para a planta adulta. Estes sintomas foram observados em algumas plântulas de *C. intermedia* provenientes das diferentes condições de armazenamento à frio e corroboram com as afirmativas destes autores.

Jyoti (2013) afirma que a perda de viabilidade resulta no agravamento do processo de deterioração das sementes e, como consequência, as mesmas apresentam reduções da germinação, degradações nos compostos de reservas, alterações na composição química, desnaturação de proteínas, entre outros danos celulares. Para Melo et al (2006), as sementes passam a ter baixo vigor e isso pode alterar parâmetros relacionados à morfologia e ao desenvolvimento das plântulas.

Trabalhos relacionados à conservação de sementes de espécies nativas dependem da formação de mudas de alta qualidade, à vista disso, é importante a definição de protocolos e estratégias que favoreçam o sucesso de propagação de *C. intermedia*.

5.5 Conclusões

As sementes recém beneficiadas expressaram seis diferentes estádios de desenvolvimento e um potencial de produção de mudas *in vitro*, em 180 dias após a semeadura em meio MS. O armazenamento de sementes de *C. intermedia* à -80°C (ultra freezer), durante quatro meses, mostrou os melhores resultados de viabilidade, germinação e desenvolvimento de parâmetros morfológicos das plântulas oriundas das sementes armazenadas, demonstrando sua maior qualidade fisiológica. Os resultados mostraram a importância dos testes de tetrazólio, germinação e de análise morfológica de parâmetros do desenvolvimento de plântulas, em conjunto, como forma de determinar a melhor temperatura e período de armazenamento das sementes de *C. intermedia*. O registro das alterações morfológicas em plântulas de *C. intermedia* oriundas de sementes armazenadas em diferentes temperaturas, permitiram identificar os danos que podem interferir na produção de mudas com qualidade.

O armazenamento a -80°C é viável e eficiente tanto para conservação de germoplasma quanto para a germinação das sementes. Este trabalho é o primeiro relato que envolve a qualidade de sementes e mudas de orquídeas da espécie *C. intermedia* oriundas de diferentes condições de armazenamento e fornece uma base para que mais estudos que envolvam a conservação *ex situ* de diferentes espécies sejam realizados.

5.6 Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação de Santa Catarina (FAPESC) pelo financiamento dessa pesquisa, ao Orquidário Carlos Gomes pelas sementes cedidas para realização deste experimento, e aos laboratórios: Laboratório de Núcleo de Pesquisas em Biotecnologia e Desenvolvimento Vegetal (NPBV), Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal (LFDGV) pela disponibilização de equipamentos, insumos e infraestrutura utilizados.

5.7 Referências

- Abrão, MCR., Jorge J, Pescador R., Ferreira WM, Suzuki, RM (2014) Germinação de sementes e desenvolvimento *in vitro* de plântulas de *Cattleya loddigesii* Lindl. (Orchidaceae). Revista Brasileira de Biociências 12(3): 141-147
- Alvarez-Pardo VM, Ferreira AG, Nunes, VF (2006) Métodos de desinfestação de sementes para o cultivo *in vitro* de orquídeas epífitas do Sul do Brasil, Horticultura Brasileira, 24: 217-220. doi: 10.1590/S0102-05362006000200019
- Alves GM, Dal Vesco LL, Guerra MP (2006) Micropropagation of the Brazilian endemic bromeliad *Vriesea reitzii* through nodule clusters culture, Scientia Horticulturae, 110:204-207
- Araújo AG, Pasqual M, Rodrigues FA, Carvalho JG, Zarraga DZA (2009) Fontes de nitrogênio no crescimento *in vitro* de plântulas de *Cattleya loddigesii* Lindl. (Orchidaceae). Acta Scientiarum: Biological Sciences Maringá, 31: 35-39. doi: 10.4025/actascibiolsci.v31i1.309
- Arditti J (1967) Factors affecting the germination of orchid seeds. The Botanical Review, 33: 1-97
- Arditti J (1992) Fundamentals of orchid biology. New York, John Wiley & Sons: 898 p.
- Baillie JEM, Hilton-Taylor C, Stuart SN (2004) IUCN Red List of Threatened Species: a global species assessment. IUCN, Gland, Switzerland
- Benson EE (1999) Cryopreservation, Plant conservation biotechnology, London, 83-95
- Bewley JD, Black M (1994) Seeds: physiology of development and germination. 2. ed. New York: Plenum Press, 445p
- Bewley JD, Bradford KJ, Hilhorst HWM, Nonogaki H (2013) Seeds: Physiology of development, germination and dormancy, 3rd ed. Springer, New York. doi: 10.1017/S0960258513000287
- Brasil (1992) Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Regras para análise de sementes. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 365p.
- Brasil (2009) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para Análise de Sementes. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, 398p
- Burke MJ, Gusta LV, Quamme HA, Weiser CJ, Li PH (1976) Freezing injury in plants, Annual Review of Plant Physiology, 27: 507-528. doi: 10.1146/annurev.pp.27.060176.002451
- Caldas LS, Haridasan P, Ferreira ME (1998) Meios Nutritivos. In: Torres, A.C.; Caldas, L.S., Buso, J.A. (Eds.). Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. v.1. Embrapa, Brasília, Distrito Federal

Carvalho NM, Nakagawa J (2012) Sementes: ciência, tecnologia e produção. 5ed. FUNEP, Jaboticabal

Castro LO, Bach EE (2007) Germinação de sementes de *Dendrobium* sp. (Orchidaceae) e cultura de tecido visando produção de mudas. Reunião Anual do Instituto Biológico, São Paulo: RAIB. p.114. doi: 10.1590/S0102-05362010000100012

Cerna M, Valdivieso P, Cella R, Mátyás B, Aucapinã C (2018) Cryopreservation of orchid seeds through rapid and step freezing methods, 7: 209. doi: 10.12688/f1000research.13622.1

Chinnusamy V, et al (2007) Cold stress regulation of gene expression in plants, Trends in Plant Science, 12: 444-451. doi: 10.1016/j.tplants.2007.07.002

Cribb PJ (1999) Morphology. In.: Pridgeon, A.M.; Cribb, P.J. & Chase, M.W. *Genera Orchidacearum: general introduction, Apostasioideae, Cypripedioideae*. Oxford: Oxford University Press: 13-23

Dearnaley JDW (2007) Further advances in orchid mycorrhizal research, Mycorrhiza, 17:475–86. doi: 10.1007/s00572-007-0138-1

Demito A, Afonso ADL (2009) Qualidade das sementes de soja resfriadas artificialmente. Engenharia na Agricultura 17: 7-14

Diengdoh RV, Kumaria S, Tandon P, Chettri das M (2017) Asymbiotic germination and seed storage of *Paphiopedilum insigne*, an endangered lady's slipper orchid, South African Journal of Botany, 112: 215-224. doi: 10.1016/j.sajb.2017.05.028

Dutra AS, Medeiros Filho S (2008) Teste de deterioração controlada na determinação do vigor em sementes de algodão, Revista Brasileira de Sementes, 30: 19-23

Engels J, Rao VR, Brown, AHD, Jackson MT (2002) Managing Plant Genetic Diversity. Wallingford

Fernandes MRC, Gomes BH, Nogueira APO (2019) Germinação e avaliação morfológica de plântulas de pimenta (*Capsicum* spp.) cultivadas *in vitro*, Revista Agrária Acadêmica, 2(3): 62-75. doi: 10.32406/v2n32019/62-75/agrariacad

Ferreira DF (2008) Análise estatística por meio do SISVAR (Sistema para Análise de Variância) para Windows versão 4.0, São Carlos: UFSCar, 45: 255-258

Ferreira WM., Vasconcelos MC, Silva CCN, Oliveira HR, Suzuki R.M (2017) Asymbiotic germination, multiplication and development of *Alatiglossum fuscopetalum* (Orchidaceae) as affected by culture medium, sucrose and growth regulators. Iheringia. Série Botânica 72(1):57-65. doi: 10.21826/2446-8231201772106

Fiona R Hay, David J Merritt, Jessica A Soanes, Kingsley W Dixon (2010) Comparative longevity of Australian orchid (Orchidaceae) seeds under experimental and low temperature

storage conditions, *Botanical Journal of the Linnean Society*, 164: 26-41. doi: 10.1111/j.1095-8339.2010.01070.x

Flora do Brasil (2020) Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: < <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/> >. Acesso em: 03 fev. 2020

Franceschi CRB, Smidt EC, Vieira LN, Ribas LLF (2019) Storage and in vitro germination of orchids (Orchidaceae) seeds from Atlantic Forest- Brazil, *An Acad Bras Cienc*, 91:3. doi: 10.1590/0001-3765201920180439

Freitas RA, Nascimento WM (2006) Teste de envelhecimento acelerado em sementes de lentilha. *Revista Brasileira de Sementes*, Pelotas 28: 59-63. doi: 10.1590/S0101-31222006000300009

Galdiano Júnior RF, Mantovani C, Cassano AO, Lemos EGM (2013) Desenvolvimento inicial e crescimento *in vitro* de *Cattleya violacea* (Kunth) Rolfe em diferentes concentrações de sacarose, *Acta Amazonica*, 43(2): 127-134. doi: 10.1590/S0044-59672013000200001

Guerra MEC, Medeiros Filho S, Gallão MI (2006) Morfologia de sementes, de plântulas e da germinação de *Copaifera langsdorfii* Desf. (Leguminosae- Caesalpinioideae), *Revista Cerne*, 12: 322-328

Guerra MP, Dal Vesco (2010) *In vitro* morphogenesis and adventitious shoot mass regeneration of *Vriesea reitzii* from nodular cultures, *Science Horticulture*, 125:748-755. doi: 10.1016/j.scienta.2010.05.030

Gutierre MAM (2001) O cultivo de orquídeas *in vitro* a partir de sementes. *Arquivos da Associação Paranaense para o Desenvolvimento do Ensino da Ciência*, 5: 12-13

Guy CL (2003) Freezing tolerance of plants: current understanding and selected emerging concepts, *Canadian Journal of Botany* 81: 1216-1223. doi: 10.1139/b03-130

Harrison CR (1977) Ultrastructural and histochemical changes during the germination of *Cattleya aurantiaca* (Orchidaceae), *Botanical Gazette*, 138: 41-45.

Hosomi ST, Santos RB, Custódio CC, Seaton PT, Marks TR, Machado Neto NB (2011) Pre conditioning *Cattleya* seeds to improve the efficiency of the tetrazolium test for viability. *Seed Science and Technology*, pp 178-189

ISTA (2017) *International Rules for Seed Testing*. Bassersdorf: International Seed Testing Association. 296p

Jyoti MCP (2013) Seed deterioration: A review, *International Journal of Life Sciences Biotechnology and Pharma Research*, 2:374-385

Juras MCR, Jorge J, Pescador R, Ferreira W de M, Tamaki V, Suzuki RM (2019) *In vitro* culture and acclimatization of *Cattleya xanthina* (Orchidaceae), an endangered orchid of the Brazilian Atlantic Rainforest. *Rodriguésia* 70: e01422017. doi: 10.1590/2175-7860201970014

- Kauth PJ, Kane ME, Vendrame WA, Reinhardt Adams C (2008) Asymbiotic germination response to Photoperiod and nutritional media in six populations of *Calopogon tuberosus* var. *tuberosus* (Orchidaceae); evidence for ecotypic differentiation, *Annals of Botany*, 102: 783-793. doi: 10.1093/aob/mcn163
- Kraus JE, Kerbauy GB, Monteiro WR (2006) Desenvolvimento de protocormos de *Catasetum pileatum* Rchb. F. *in vitro*: aspectos estruturais e concentuais, *Hoehnea*, 33: 177-184
- Kulus D (2019) Managing plant genetic resources using low and ultra-low temperature storage: a case study of tomato. *Biodiversity and Conservation*. doi: 10.1007/s10531-019-01710-1
- Leroux G, Barabé D, Vieth J (1997) Morphogenesis of the protocorm of *Cypripedium acaule* (Orchidaceae), *Plant Systematics and Evolution*, 205: 53-72. doi: 10.1007/BF00982797
- Lopes WAL, Souza LA (2015) Morphoanatomy of *Serjania communis* Cambess. Seedling, *Acta Scientiarum, Biological Sciences*, 37: 377-383. doi: 10.4025/actasciobiolsci.v37i3.27484
- Machado Neto NB, Custódio CC (2005) Orchid conservation through seed banking: ins and outs 26: 229-235
- Magrini S, De Vitis M, Torelli D, Santi L, Zucconi L (2019) Seed banking of terrestrial orchids: evaluation of seed quality in *Anacamptis* following 4-year dry storage, *Plant biology*, 21:544-550. doi: 10.1111/plb.12936
- Marcos Filho J (2015) *Fisiologia de sementes de plantas cultivadas*. 2.ed. ABRATES, Londrina, PR
- Mayrinck RC, Vaz TAA, Davide AC (2016) Classificação fisiológica de sementes florestais quanto à tolerância à dessecação e ao comportamento no Armazenamento. *Cerne*, 22(1): 85-92. doi: 10.1590/01047760201622012064
- Melo JT, Silva JÁ, Torres RAA, Silveira CES, Caldas LS (1998) Coleta, propagação e desenvolvimento inicial de espécies do cerrado, *Cerrado: ambiente e flora*, 195-246
- Mello CMC (2000) *Conservação de sementes de orquídeas do cerrado*, Universidade de Brasília, Dissertação de mestrado em biologia
- Mello PTBS, Schuch LOB, Assis FN, Concenço G (2006) Comportamento individual de plantas originadas de sementes com diferentes níveis de qualidade fisiológica em populações de arroz irrigado, *Revista Brasileira de Sementes*, 28: 84-94
- Menezes NL, Villela FA (2009) O Potencial de armazenamento de cada semente. *Seed News* 8(4): 22-25

- Merritt DJ, Hay FR, Swarts ND, Sommerville KD, Dixon Kw (2014) *Ex situ* conservation and cryopreservation of orchid germplasm. *International Journal of Plant Sciences* 175: 46-58. doi: 10.1086/673370
- Muller TS, Dewes D, Karsten J, Schulter AR, Stefanello S (2007) Crescimento *in vitro* e aclimação de plântulas de *Miltonia flavascens*, *Revista Brasileira de Biociências*, Porto Alegre 5: 252-254
- Murashige T, Skoog FA (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with *tobacco tissue* cultures. *Physiologia plantarum*, Copenhagen, 15: 473-497
- Nakagawa J (2015) Testes de vigor baseados no desempenho das plântulas. In: Krzyzanowski FC, Vieira RD, França Neto JB (Eds). *Vigor de sementes: conceitos e testes*. Informativo Abrates, Londrina, 1: 2-21
- Nikishina TV et al (2001) Effect of cryopreservation on seed germination of rate tropical orchids. *Russian Journal of Plant Physiology*, 48: 810-815. doi: 10.1023/A:1012520927743
- Pádua GP (1998) Vigor de sementes e seus possíveis efeitos sobre a emergência em campo e a produtividade. *Informativo Abrates*, Londrina, 8: 46-48
- Pence VC (2011) Evaluating costs for the *in vitro* propagation and preservation of endangered plants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 47: 176-187. doi: 10.1007/s11627-010-9323-6
- Popinigis F (1977) *Fisiologia da semente*. Brasília, Agiplan, pp 289
- Pridgeon AM, Cribb PJ, Chase MW, Rasmussen FN (2005) *Genera Orchidacearum*, v. 4 Epidendroideae (part 1). Oxford University Press, New York: 696p
- Pritchard HW (1984) Liquid nitrogen preservation of terrestrial and epiphytic orchid seed, *Cryo-Letters*, 5: 295-30
- Pritchard HW, Seaton PT (1993) Orchid seed storage: historical perspective, current status, and future prospects for long-term conservation, *Selbyana*, 14:89-104
- Pritchard HW, Pointer LCA, Seaton TP (1999) Interspecific variation in orchid seed longevity in relation to ultra-dry storage and cryopreservation. *Lindleyana*, Palm Beach, 14: 92-101
- Rasmussen HN (1995) *Terrestrial orchids from seed to mycotrophic plant*. Cambridge University Press, New York, USA, 464
- Rech AR, Rosa YBCJ, Rosa Junior EJ (2011) Levantamento e características ecológicas de Orchidaceae da mata ciliar do Rio Dourados, Dourados-MS, *Revista Árvore*, 35:717-724
- Ruelland E, Zachowski A (2010) How plants sense temperature, *Environ Exp Bot*, 69:225-232. doi: 10.1016/j.envexpbot.2010.05.011

- Santos DL, Sugahara VY, Takaki M (2005) Efeito da luz e da temperatura na germinação de sementes de *Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nich, *Tabebuia chrysotricha* (Mart. Ex DC.) Standl e *Tabebuia roseo-alba* (Ridl) Sand Bignoniaceae, *Ciência Florestal*, 15:87-92
- Santos IRI, Salomão IN (2010) Manual de curadores de germoplasma – vegetal: Criopreservação. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
- Schuch LOB, Nedel JL, Assis FN (1999) Crescimento em laboratório de plântulas de aveia preta (*Avena strigosa* Schreb.) em função do vigor das sementes, *Revista Brasileira de Sementes*, 21: 229-234
- Seaton PT, Halies NSJ (1989) Effect of temperature and moisture content on the viability of *Cattleya aurantiaca* seed. In: pritchard HW. Modern methods in orchid conservation; the role of physiology, ecology and management. Cambridge: University Press, p 17-29
- Seeni S, Latha PG (2000) *In vitro* multiplication and ecorehabilitation of the endangered Blue Vanda, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 61:1-8. doi: 10.1023/A:1006444614657
- Silva A, Figliolia MB, Aguiar IB, Perecin D (2001) Liofilização e armazenamento de sementes de ipê-rosa (*Tabebuia heterophylla* (A.P. Candolle) Britton) Bignoniaceae, *Revista Brasileira de Sementes*, Brasília, 25: 252-259. doi: 10.17801/0101-3122/rbs.v23n1p252-259
- Silva CS, Araújo LG, Sousa KCI, Silva DM, Sibov ST, Faria PR (2017) Germinação e desenvolvimento *in vitro* de orquídea epífita do Cerrado. *Ornamental Horticulturae* 23: 96-100
- Stewart SL, Zettler LW (2002) Symbiotic germination of three semi-aquatic rein orchids (*Habenaria repens*, *H. quinqueseta*, *H. macroceratitis*) from Florida. *Aquat Bot* 72: 25-35
- Suzuki RM, Almeida, V da, Pescador R, Ferreira W de M (2010) Germinação e crescimento *in vitro* de *Cattleya bicolor* Lindley (Orchidaceae). *Hoehnea*, São Paulo, 37: 731-742. doi: 10.1590/S2236-89062010000400004
- Suzuki RM, Moreira VC, Rosete P, Ferreira WM (2012) Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of the threatened orchid *Hoffmannseggella cinnabarina*. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*. 48: 500-511. doi: 10.1007/s11627-012-9460-1
- Tombolato AFC, Rivas EB, Coutinho LN, Bergmann EC, Imenes SDL, Furlani PR, Castro CEF de, Matthes LAF, Saes LA, Costa AMM, Tagliacozzo GMD, Leme JM (2002) O cultivo de antúrio: Produção comercial. Campinas: Instituto Agrônômico de Campinas, 33p
- Utami ESW, Hariyanto S (2019) *In vitro* seed germination and seedling development of a rare Indonesian native orchid *Phalaenopsis amboinensis* J.J.Sm. *Scientifica Article* 8105138. 6p. doi: 10.1155/2019/8105138
- Vendrame WA, Faria RT, Sorace M, Sahyun AS (2014) Orchid cryopreservation, *Ciência e Agrotecnologia*, 38: 213-229. doi: 10.1590/S1413-70542014000300001.

6 CAPÍTULO 2- Caracterização anatômica e histoquímica de sementes de *Cattleya intermedia* Graham ex Hook. submetidas a diferentes condições de armazenamento

Resumo

Estudos que envolvem alterações morfológicas e anatômicas decorrentes do armazenamento de sementes são escassos, porém relevantes para garantir informações relacionadas a qualidade de sementes e mudas originadas a partir dessas. Os objetivos desse trabalho foram realizar a caracterização anatômica e histoquímica de sementes da orquídea *Cattleya intermedia*, verificando a ocorrência de possíveis alterações decorrentes de diferentes temperaturas e períodos de armazenamento. Os tratamentos consistiram das temperaturas de: 25 (\pm 2°C) (ambiente), -20°C (freezer), -80°C (ultra freezer) e -196°C (criopreservação) e períodos de armazenamento: dois, quatro e seis meses. Para as análises anatômicas e histoquímicas foram realizadas a microscopia eletrônica de varredura e a microscopia de luz com colorações de azul de toluidina (ATO), azul brilhante de coomassie (CBB), Sudan IV e ácido periódico de Schiff (PAS). A desidratação observada nas sementes foi considerada o principal dano decorrente do armazenamento. Este foi responsável pela perda da viabilidade das sementes. Também foram observadas alterações nas estruturas internas das sementes, como a degeneração, causando reduções nos principais componentes de reservas. A temperatura de -80°C (ultra freezer) durante os períodos de dois e quatro meses mostrou-se eficiente na conservação dos tecidos e células das sementes, corroborando com os dados encontrados no capítulo 1 sobre a qualidade de sementes e mudas originadas a partir destas. Este trabalho forneceu informações importantes para melhor entendimento do comportamento das sementes quando submetidas ao armazenamento em diferentes condições de temperatura, além de serem resultados inéditos para *C. intermedia*.

Palavras-chave: Orchidaceae, reservas das sementes, armazenamento a frio, danos de armazenamento.

Abstract

Studies involving morphological and anatomical changes resulting from the storage of seeds are scarce, but relevant to guarantee information related to the quality of seeds and seedlings originated from these. The objectives of this work were to perform the anatomical and

histochemical characterization of the seeds of the orchid *Cattleya intermedia*, verifying the occurrence of possible changes resulting from different temperatures and storage periods. The treatments consisted of the temperatures of: 25 ($\pm 2^\circ\text{C}$) (room), -20°C (freezer), -80°C (ultra freezer) and -196°C (cryopreservation) and storage periods: two, four and six months. For anatomical and histochemical analyzes, scanning electron microscopy and light microscopy were performed with colorings of toluidine blue (TB-O), coomassie bright blue (CBB), Sudan IV and and periodic acid-Schiff (PAS). The dehydration observed in the seeds was considered the main damage resulting from storage. This was responsible for the loss of seed viability. Changes were also observed in the internal structures of the seeds, such as degeneration, causing reductions in the main components of reserves. The temperature of -80°C (ultra freezer) during the periods of two and four months proved to be efficient in the conservation of tissues and seed cells, corroborating with the data found in chapter 1 on the quality of seeds and seedlings originated from of these. This work provided important information to better understand the behavior of seeds when submitted to storage under different temperature conditions, in addition to being unprecedented results for *C. intermedia*.

Key -words: Orchidaceae, seed reserves, cold storage, storage damage.

6.1 Introdução

Orchidaceae é a maior e mais antiga família botânica entre as plantas superiores, com 899 gêneros, possuindo 27.801 representantes distribuídos ao longo do planeta (The Plant List, 2020). No Brasil, estão descritos 252 gêneros e 2.807 espécies, sendo que estas apresentam diversas adaptações morfológicas, anatômicas e fisiológicas, tendo assim folhas, caules e raízes extremamente especializados, fazendo com que as espécies adquirissem a capacidade de ocupar diversos habitats (Flora do Brasil em construção. 2020; Silva et al. 2006).

Apesar disso, muitas espécies de orquídeas estão desaparecendo de seu ambiente natural de forma alarmante, fazendo com que entrem em risco de extinção ou quase extinção, devido à destruição de seus habitats, ao extrativismo e à exploração ilegal dos recursos ambientais (Galdiano Júnior et al. 2013). Dentre estas espécies, encontra-se a *Cattleya intermedia* Graham ex Hook., a qual está incluída na categoria vulnerável da Lista Vermelha da Flora do Brasil (CNC Flora 2012).

Diante da importância das orquídeas para a natureza, muitos estudos têm como objetivo a conservação e a elaboração de métodos para a preservação dessas espécies sendo considerados essenciais e necessários. Dentre as estratégias de conservação, o armazenamento de sementes é uma ferramenta importante da conservação *ex situ*. Entretanto, o sucesso da conservação irá depender da capacidade de manter as sementes vivas e com qualidade durante o armazenamento (Barbedo e Santos Júnior. 2018).

O conhecimento do comportamento fisiológico e de possíveis alterações anatômicas durante o armazenamento das sementes se faz necessário, em razão das exigências particulares de cada espécie e para garantir melhores condições em relação à manutenção da longevidade e à prevenção aos danos que possam ocorrer durante o armazenamento (Nery et al. 2014). Sugere-se que as sementes de orquídeas apresentam comportamento ortodoxo, e neste caso, são tolerantes ao congelamento em temperaturas extremamente baixas, incluindo o método de criopreservação (Pritchard et al. 1999; Hay e Probert. 2013).

A fim de que os resultados do armazenamento de sementes sejam positivos, estas devem ser submetidas a condições adequadas (Becerra-Vázquez et al. 2018). Mas, mesmo em condições ideais as sementes podem sofrer processo de deterioração dependendo das condições do ambiente e das características da própria semente (Felix et al., 2017). Em razão disso, estudos que reduzem os efeitos da deterioração durante a etapa do armazenamento são particularmente importantes (Terskikh et al. 2008). Logo, o emprego das baixas temperaturas promove a redução das reações químicas, preservando a qualidade fisiológica por maior período e reduzindo o processo de deterioração das sementes (Gonçalves et al. 2018).

O sucesso e a longevidade do armazenamento das sementes também são influenciados pelos componentes de reservas presentes nas mesmas, e isso pode variar entre as diferentes espécies (Cavalho e Nakagawa. 2000). McDonald (1999) afirma que sementes que contém elevado teor de óleo são mais favoráveis a deterioração, uma vez que os lipídios possuem menor estabilidade química. As sementes de orquídeas são classificadas como oleosas e ricas em reservas lipídicas, o que pode facilitar a ocorrência da deterioração, principalmente em temperatura mais elevada (Arditti 1992; Colville et al. 2016, Fanan et al. 2009).

Outro fator relacionado ao sucesso do armazenamento é o conhecimento de aspectos relacionados à morfologia e à anatomia das sementes, antes e depois da armazenagem. A obtenção dessas informações permite a conservação *ex situ*, em especial de espécies nativas. Até então, para as sementes de orquídeas há poucos registros dos aspectos morfológicos e

anatômicos das suas sementes, visto que, elas são consideradas bastante diminutas e seu embrião contém poucas células de reserva (Koopowitz 2001). Diante do exposto, trabalhos relacionados a aspectos morfoanatômicos de sementes dessa família se tornam extremamente relevantes para a elucidação de novas informações relacionadas a sua preservação (Ferreira 2000; Molvray e Kores 1995).

Alterações provocadas nas sementes resultantes das condições de armazenamento podem ocorrer e necessitam ser estudadas (Silva et al. 2011). Por isso, o uso de técnicas histoquímicas associadas a estudos de anatomia são ferramentas importantes para melhor visualização e compreensão das alterações decorrentes do envelhecimento das sementes durante o armazenamento (Gallão et al. 2006; Bewley et al. 2013; Lima et al. 2018).

Investigações morfológicas e anatômicas em sementes de orquídeas do gênero *Cattleya*, submetidas ao armazenamento são consideradas incipientes, mesmo sendo relevantes para garantir a preservação das mesmas. Pouco se conhece acerca das alterações que ocorrem nas sementes durante a etapa do armazenamento, por isso, os objetivos do presente trabalho foram realizar a caracterização anatômica e histoquímica de sementes de orquídea da espécie *C. intermedia*, verificando a ocorrência de possíveis alterações decorrentes das diferentes temperaturas e períodos de armazenamento.

6.2 Material e Métodos

6.2.1 Material vegetal e local do experimento

As sementes de *C. intermedia* foram retiradas de cápsulas maduras e no início da deiscência, provenientes do Orquidário Carlos Gomes, localizado no Ribeirão da Ilha, na cidade de Florianópolis (-27°35'48'' de latitude sul; -48°32'57'' de longitude oeste, altitude 3 m) em Santa Catarina. A coleta foi realizada em março de 2019. Após a coleta as sementes foram transportadas em sacos plásticos para o Laboratório de Núcleo de Pesquisas em Biotecnologia e Desenvolvimento Vegetal (NPBV) do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), campus Florianópolis/SC para a realização da desinfestação superficial em solução de água, hipoclorito de sódio comercial (Q-Boa®) a 0,4 % e detergente neutro. A secagem das cápsulas foi realizada em temperatura ambiente (25°C) por 4 horas (adaptado de Alvarez-Pardo et al. 2006).

A abertura das cápsulas foi executada com o auxílio de um estilete e as sementes retiradas. Pelo método proposto no manual de Regras de Análise de Sementes (Brasil 2009) foi

determinado o teor de umidade inicial. Foram separadas quatro repetições contendo 100 mg de sementes, colocadas em sacos de papel fino e pesadas em balança analítica (Schimadzu AUY220) para determinação da massa fresca, em seguida foram mantidas em estufa (Solab SL100) a temperatura de 105° C por 24 horas para a determinação da massa seca. O teor de umidade das sementes foi obtido pela média da diferença entre a massa fresca e a massa seca das repetições, dividido pela massa seca, e os valores expresso em porcentagem (%) da massa fresca (Bewley & Black, 1994). Posteriormente as mesmas foram submetidas aos diferentes tratamentos de armazenamento no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal (LFDGV/CCA/UFSC).

6.2.2 Delineamento experimental e condições de armazenamento das sementes

Foi empregado o delineamento experimental inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 4 x 3 (temperaturas x períodos) com doze tratamentos, quatro repetições e o total de 48 parcelas. A unidade experimental foi representada por um microtubo (2 mL) contendo as sementes. Os tratamentos constaram em quatro condições de temperatura: 25 (\pm 2°C) (ambiente), -20°C (freezer), -80°C (ultra freezer) e -196°C (criopreservação) e três períodos de armazenamento (dois, quatro e seis meses). Foi avaliado uma porção de sementes referente ao tempo zero de armazenamento.

Para cada tratamento foram separadas 100mg de sementes, que foram mantidas no escuro durante todas as condições de armazenamento. Nas condições de temperatura de 25 (\pm 2°C) (ambiente), -20°C (freezer) e -80°C (ultra freezer) as sementes foram armazenadas em microtubos (2mL) de plásticos vedados e envoltos em papel alumínio. Na temperatura de -196°C (criopreservação) as sementes foram armazenadas em criotubos (2mL) e imersos diretamente em nitrogênio líquido.

As sementes mantidas nas temperaturas de -20°C (freezer), -80°C (ultra freezer) e -196°C (criopreservação), nos diferentes períodos de armazenamento, passaram por descongelamento rápido, conforme método de Santos e Salomão (2010). O descongelamento consistiu em manter as sementes em condições de banho maria, à 40°C por 2 minutos. Posteriormente foi realizada a preparação do material para as análises anatômicas e histoquímicas.

6.2.3 Análise sob microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As sementes de *C. intermedia* foram submetidas à análise ultraestrutural por microscopia eletrônica de varredura. Para isso, as amostras de sementes de cada tratamento de armazenamento foram fixadas em solução de glutaraldeído (2,5%), sacarose (2%) e tampão cacodilato de sódio (0,1M) à vácuo, durante uma semana. Depois, foi realizada a lavagem e desidratação, em séries de gradiente etílico (30%, 50%, 70%, 90% e 100%), durante 30 minutos em cada concentração, exceto o álcool etílico 100%, onde foram realizadas duas adições, de 30 minutos cada (adaptado de Schmidt et al. 2012).

Após a desidratação, as amostras foram submetidas ao solvente hexametildisilazano (HMDS) e aderidas sobre suportes de alumínio (stubs), com o auxílio de fita de carbono dupla face. Posteriormente foi realizado o recobrimento das amostras com 20 nm de ouro, em metalizador (Baltec, CED 030) (Schmidt et al., 2012). As amostras foram observadas e fotografadas em microscópio eletrônico de varredura (Jeol JSM-6390LV), do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME/UFSC).

6.2.4 Análise sob microscopia de luz (ML)

As sementes de *C. intermedia* foram submetidas às análises anatômicas, por microscopia de luz, conforme método descrito por Johansen (1940). Amostras de sementes de cada tratamento de armazenamento foram fixadas em solução de glutaraldeído (2,5%) e tampão fosfato de sódio (0,1M), na proporção 1:1, à vácuo por uma semana. Em seguida, foram lavadas em tampão fosfato por três vezes e desidratadas em séries de gradiente etílico (30%, 50%, 70%, 90% e 100%), durante 40 minutos. Após a desidratação as amostras foram pré-infiltradas em historesina Leica™ com álcool etílico PA na proporção de 1:1, durante 72 horas e infiltradas em historesina Leica™, de acordo com as instruções do fabricante. O material infiltrado foi mantido em estufa a 35°C durante 3 dias. Secções com 5µm de espessura foram obtidos por micrótomo manual rotativo (microTec, CUT 4055).

Para as análises histoquímicas, as amostras foram tratadas com azul de toluidina (ATO) para a identificação dos polissacarídeos ácidos, azul brilhante de coomassie (CBB) para identificação de proteínas, Sudan IV para a identificação de lipídios e ácido periódico de Schiff (PAS) para identificação de polissacarídeos neutros (amido e celulose) (Ventrella et al. 2013).

Os materiais foram analisados em microscópio de luz (Olympus BX-40), com os registros feitos por câmera digital colorida de alta resolução (Olympus DP71) e Software Image

Q Capture Pro 5.1, no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal (LFDGV/CCA/UFSC).

6.3 Resultados

6.3.1 Caracterização de sementes não submetidas ao armazenamento

As estruturas de *C. intermedia* podem ser observadas na figura 1. Em 1A pode-se ver a morfologia da flor, típica desta espécie. Em 1B, os frutos com as sementes em seu interior apresentam os restos das pétalas senescentes e o início da abertura. As milhares de sementes contidas no interior dos frutos apresentam-se diminutas e assemelham-se a um pó (Figura 1C). Essas sementes podem apresentar-se viáveis (embriões marcados pelo tetrazólio) ou inviáveis (sementes sem embrião) (Figura 1D). Em 1E foi observado que as sementes apresentam formato filiforme, evidenciando a testa, as extremidades calazal e micropilar e a região intumescida da semente, onde fica localizado o embrião, que está revestido pela testa. As células formadoras da testa são lisas a lineares e não apresentam ornamentações entre as paredes (Figura 1F). O embrião no formato elipsóide está localizado ao centro da semente, observa-se células maiores na região micropilar e células menores na região calazal, o que caracteriza a bipolaridade no embrião. Este ainda, contém as principais células de reserva, e está conectado a um suspensor multicelular (Figura 1G). As principais reservas presentes nas células embrionárias das sementes de *C. intermedia* recém beneficiadas foram as proteínas (reativas com azul brilhante de coomassie) (Figura 1H), lipídios nas células de revestimento, caracterizando uma cutícula diferenciada (reativos com Sudan IV) (Figura 1I), além do acúmulo de reservas de amido (reativos com ácido periódico de Schiff) (Figura 1J).

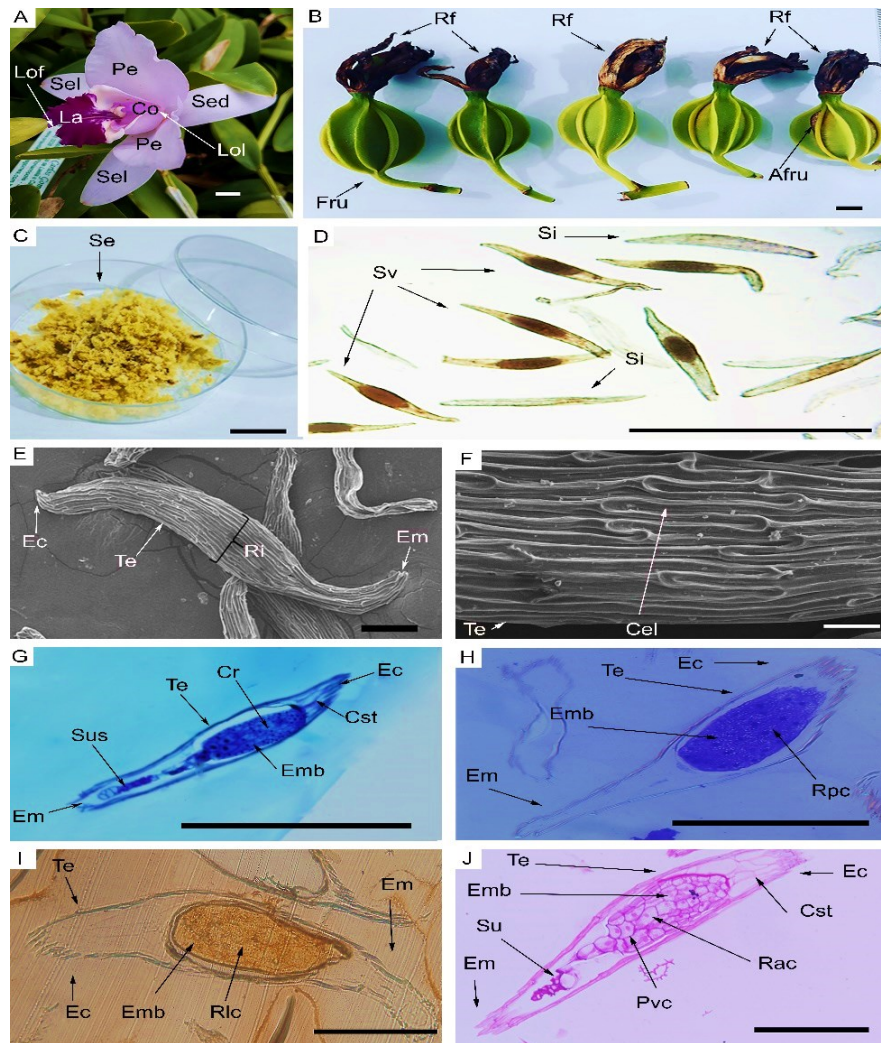


Figura 1 Estruturas, microscopia eletrônica de varredura e microscopia de luz de *Cattleya intermedia*. **A.** Peças florais. **B.** Frutos com restos florais. Pode-se identificar o início da abertura para liberação das sementes. **C.** Sementes extraídas dos frutos. **D.** Sementes submetidas ao teste de tetrazólio, mostrando embriões viáveis (corados pelo tetrazólio) e sementes inviáveis (sem a presença do embrião). **E.** Semente filiforme, evidenciando a testa, as extremidades calazal e micopilar e a região intumescida (chave) onde está localizado o embrião. **F.** Detalhes das células formadoras da testa. **G.** ATO: semente com as células da testa, embrião e suspensor, evidenciadas pela ação do reagente com compostos celulósicos e pectinas. **H.** CBB: semente mostrando a reserva proteica nas células embrionárias. **I.** Sudan IV: semente com células embrionárias evidenciadas pela ação do reagente com reservas lipídicas. **J.** PAS: semente com células da testa, embrião e suspensor marcadas pela ação do reagente com o amido e a celulose. Afru, abertura dos frutos; ATO, azul de toluidina; CBB, azul brilhante de coomassie; Cel, célula formadora da testa; Co, coluna; Cr, célula de reserva; Cst, célula superficial da testa; Ec, extremidade calazal; Em, extremidade micopilar; Emb, embrião elipsóide; Fru, frutos; La, labelo; Lof, lóbulos frontais; Lol, lóbulos laterais; PAS, ácido periódico de Schiff; Pe, pétala; Pvc, parede vegetal celulósica; Rac, reserva amilácea nas células embrionárias; Re, restos florais; Ri, região intumescida da semente; Rlc, reserva lipídica nas células embrionárias; Rpc, reserva proteica nas células embrionárias; Se, sementes; Sed, sépala dorsal; Sef, semente com formato filiforme; Sel, sépala lateral; Si, semente inviável; Sus, suspensor; Sv, semente viável; Te, testa da semente. Barra de escala: **A, B, C**- 1 cm; **D**- 1 mm; **E**- 100 μ m; **F**- 20 μ m; **G**- 500 μ m; **H, I, J**- 200 μ m.

6.3.2 Análise das sementes sob microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Sementes viáveis e inviáveis de *C. intermedia* submetidas a diferentes temperaturas e períodos de armazenamento podem ser observadas nas figuras abaixo. Nas sementes

armazenadas em temperatura de $25 (\pm 2^\circ\text{C})$ (ambiente) foram verificadas sementes viáveis, estas foram caracterizadas por apresentar a região próxima do embrião intumescida, enquanto as sementes inviáveis apresentaram dano por desidratação ao longo do período em que permaneceram armazenadas. Aos dois meses foi verificado início da desidratação das sementes (Fig. 2A), a partir de quatro (Fig. 2B) e seis meses (Fig. 3C) o dano por desidratação foi de maior intensidade. Em sementes armazenadas em temperatura de -20°C (freezer) as sementes viáveis também foram caracterizadas por possuir a região próxima ao embrião intumescida, enquanto as sementes inviáveis evidenciaram dano por desidratação, no período de dois (Fig. 2D), quatro (Fig. 2E) e seis meses (Fig. 2F) de armazenamento. Na temperatura de -80°C (ultra freezer) as sementes viáveis foram caracterizadas por possuir região intumescida da semente, próximo ao embrião, e as sementes inviáveis evidenciaram dano por desidratação, em dois (Fig. 2G), quatro (Fig. 2H) e seis meses (Fig. 2I). Enquanto as sementes armazenadas em temperatura de -196°C (criopreservação) apresentaram-se viáveis, com a região do embrião intumescida e inviáveis evidenciando dano por desidratação, logo após o armazenamento de dois (Fig. 2J), quatro, sendo que para a semente viável foi observado ruptura do tegumento (Fig. 2K) e seis meses (Fig. 2L).

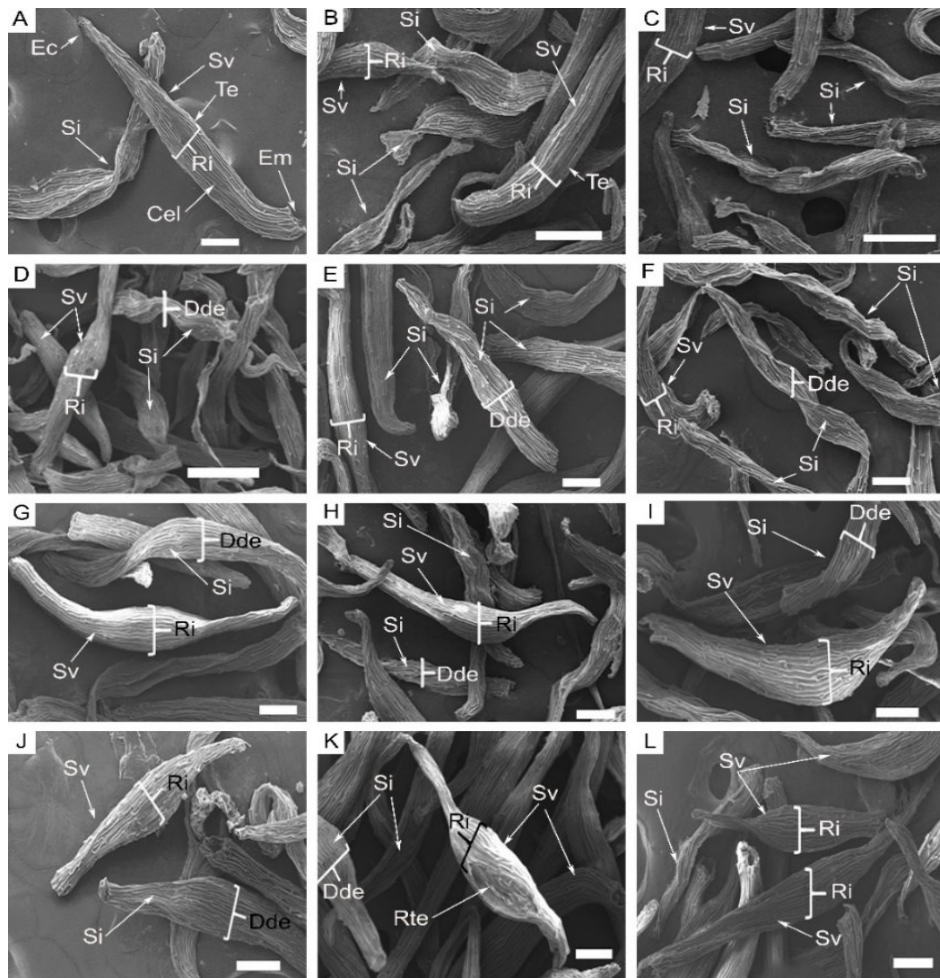


Figura 2 Microscopia eletrônica de varredura de sementes de *Cattleya intermedia* submetidas a diferentes temperaturas e períodos de armazenamento. **Temperatura de 25 (\pm 2°C): A. (dois meses)** semente viável, evidenciando a testa, as extremidades calazal e micropilar e a região intumescida (chave) onde está localizado o embrião. Observa-se semente inviável, com dano por desidratação. **B. (quatro meses)** sementes viáveis, evidenciando a testa e região intumescida (chave). Predominância de sementes desidratadas. **C. (seis meses)** semente viável evidenciando região intumescida, onde está localizado o embrião. Predominância de sementes inviáveis e desidratadas. **Temperatura de -20°C: D. (dois meses)** sementes viáveis, evidenciando região intumescida (chave) e sementes inviáveis, evidenciando dano por desidratação (chave). **E. (quatro meses)** semente viável, evidenciando região intumescida (chave) e sementes inviáveis, desidratadas (chave). **F. (seis meses)** semente viável, evidenciando região intumescida (chave). Predominância de sementes inviáveis e desidratadas (chave). **Temperatura de -80°C: G. (dois meses)** semente viável, evidenciando região intumescida (chave), onde está localizado o embrião e semente inviável, evidenciando dano por desidratação (chave). **H. (quatro meses)** semente viável, evidenciando região intumescida (chave), onde está localizado o embrião e sementes inviáveis, desidratadas (chave). **I. (seis meses)** semente viável, evidenciando região intumescida (chave), onde está localizado o embrião. Predominância de sementes inviáveis, evidenciando dano por desidratação (chave). **Temperatura de -196°C: J. (dois meses)** semente viável, evidenciando região intumescida (chave), onde está localizado o embrião e semente inviável, evidenciando dano por desidratação (chave). **K. (quatro meses)** sementes viáveis, evidenciando região intumescida (chave). Percebe-se ruptura de tegumento em semente da amostra e sementes inviáveis, desidratadas (chave). **L. (seis meses)** sementes viáveis, evidenciando região intumescida (chave), onde está localizado o embrião e semente inviável. Cel, célula formadora da testa; Dde, dano de desidratação; Ec, extremidade calazal; Em, extremidade micropilar; Rte, ruptura do tegumento da testa; Si, semente inviável; Sv, semente viável; Te, testa. Barra de escala: A, E, F, G, H, I, J, K, L- 100 μ m; B, C, D- 200 μ m.

6.3.3 Análise histoquímica com azul de toluidina (ATO)

Características anatômicas de sementes de *C. intermedia* submetidas a diferentes temperaturas e períodos de armazenamento por microscopia de luz e análise histoquímica com ATO podem ser observadas nas figuras abaixo. As reações metacromáticas observadas mostraram coloração roxa nas paredes celulares indicando a natureza péctica. Sementes armazenadas em temperatura de 25 ($\pm 2^\circ\text{C}$) (ambiente) por dois meses evidenciaram o tegumento e as células do embrião, porém pouco reagentes ao ATO. Observa-se também a vacuolização das células do suspensor, devido à falta de reação com o produto químico (Fig. 3A). Após quatro meses, as sementes apresentaram embrião pouco reagente e com aparente vacuolização nas células embrionárias, por conta do processo de degeneração (Fig. 3B). Em seis meses nota-se pouca reação das células embrionárias com o ATO, além de ausência de reação nas células do suspensor, por conta da degeneração presente nestas estruturas (Fig. 3C). Para as sementes armazenadas em temperatura de -20°C (freezer) durante dois meses foi observado sementes com a extremidade calazal e as células superficiais da testa evidenciadas pela reação com ATO. Percebe-se evidências de vacuolização nas células do embrião, devido à ausência de reação com o produto químico, além do suspensor e as demais células com diferentes intensidades de reação com o ATO (Fig. 3D). Em quatro meses, as sementes mostram células embrionárias reagentes e o suspensor em aparente degeneração, devido a menor reação com o produto químico (Fig. 3E). Após seis meses, a semente evidencia a testa desidratada, e as células embrionárias reagentes ao ATO. Observa-se a ausência do suspensor, pela falta de reação com o ATO (Fig. 3F). Nas sementes armazenadas na temperatura de -80°C (ultra freezer) por dois meses foram evidenciadas células embrionárias com diferentes intensidades de reação com ATO. Ainda foram observados danos na estrutura da testa e aparente degeneração das células do suspensor, por conta, da falta de reação com ATO (Fig. 3G). Em quatro meses, observaram-se células embrionárias reagentes ao ATO e ausência de reação nas células do suspensor (Fig. 3H). Após seis meses, as sementes mostraram diferentes reações com ATO nas células embrionárias e aparente vacuolização destas. Percebe-se ausência e degeneração da estrutura do suspensor, devido à ausência de reação com as células do suspensor em uma das sementes (Fig. 3I). Em sementes armazenadas em temperatura de -196°C (criopreservação) durante dois meses é possível observar semente vazia, devido à ausência de reação com ATO nas estruturas internas das sementes, enquanto na semente preservada, observa-se reação das células embrionárias com ATO e as células do suspensor mostram diferentes intensidades de

reação, evidenciando degeneração das paredes celulares (Fig. 3J). Em quatro meses, percebe-se vacuolização nas células embrionárias, estas evidenciadas pela falta de reação com ATO e o suspensor em degeneração, apresentado células menos reagentes ao produto (Fig. 3K). Após seis meses, é verificada células embrionárias com diferentes intensidades de reação com ATO, além de sementes com degeneração ou ausência do suspensor, devido a menor intensidade ou ausência de reação das células com o produto químico (Fig. 3L).

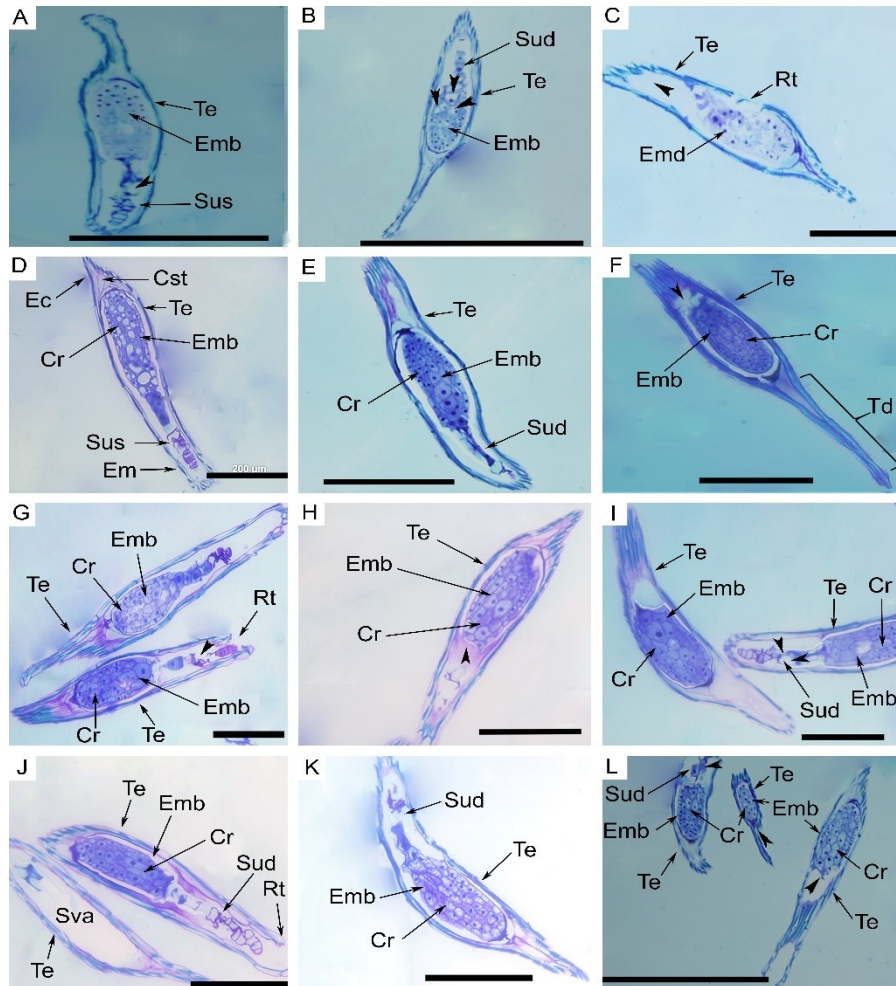


Figura 3 Microscopia de luz e análise histoquímica com ATO de sementes de *Cattleya. intermedia* submetidas a diferentes temperaturas e períodos de armazenamento. **Temperatura de 25 (\pm 2°C):** **A. (dois meses)** Semente evidenciando tegumento reagente e células do embrião pouco reagentes ao ATO. Percebe-se a vacuolização das células do suspensor (ponta de seta), pela ausência de reação com o produto. **B. (quatro meses)** Semente mostrando embrião com células pouco reagentes ao ATO e com aparente vacuolização (pontas de seta). **C. (seis meses)** Semente mostrando pouca reação das células embrionárias com ATO e ausência de reação com células do suspensor (ponta de seta). **Temperatura de -20°C:** **D. (dois meses)** Semente mostrando a extremidade calazal com as células superficiais da testa evidenciadas pela reação com ATO. As células de reserva do embrião apresentam evidências de vacuolização pela ausência de reação com o produto químico. Pode-se perceber o suspensor e demais células com diferentes intensidades de reação com ATO. **E. (quatro meses)** Semente apresentando células embrionárias reagentes e suspensor em aparente degeneração devido à menor reação com ATO. **F. (seis meses)** Semente apresentando a testa desidratada (chave), células embrionárias reagentes ao ATO e a ausência do suspensor, pela falta de reação com o produto (ponta de seta). **Temperatura de -80°C:** **G. (dois meses)** Sementes mostrando diferentes intensidades de reação das células embrionárias com ATO, danos causados à testa e aparente degeneração de células do suspensor devido à falta de reação com o produto químico (ponta de

seta). **H. (quatro meses)** Semente mostrando células embrionárias reagentes ao ATO e ausência de reação com células do suspensor (ponta de seta). **I. (seis meses)** Sementes mostrando diferentes reações das células embrionárias com o ATO e aparente vacuolização. Pode-se perceber a ausência de reação com células do suspensor em uma das sementes, evidenciando sua degeneração (pontas de seta). **Temperatura de -196°C: J. (dois meses)** Pode-se observar semente vazia pela ausência de reação de estruturas internas com ATO. Na semente preservada vemos as células embrionárias reagentes ao produto. Já as células do suspensor, mostram diferentes intensidades de reação, evidenciando degeneração das paredes celulares. **K. (quatro meses)** Semente mostrando células embrionárias com vacuolização evidenciada pela ausência de reação com ATO. Suspensor em degeneração, mostrando células menos reagentes ao produto. **L. (seis meses)** Sementes mostrando diferentes intensidades de reação das células embrionárias com ATO. Percebe-se a degeneração ou a ausência do suspensor, devido menor intensidade ou à ausência de reação das células com o produto (pontas de seta). Cr, célula de reserva; Cst, célula superficial da testa; Ec, extremidade calazal; Em, extremidade micropilar; Emb, embrião elipsóide; Emd, embrião em degeneração; Rt, ruptura da testa; Se, semente; Sud, suspensor em degeneração; Sus, suspensor; Sva, semente vazia; Td, testa desidratada; Te, testa. Barra de escala: **A, B, E, F, H, L-** 500 μm ; **C, D, G, I, J, K-** 200 μm .

6.3.4 Análise histoquímica com azul brilhante de coomassie (CBB)

Na figura 4 são observadas a microscopia de luz e análise histoquímica com CBB de sementes de *C. intermedia* submetidas a diferentes temperaturas e períodos de armazenamento. Sementes armazenadas em temperatura de 25 (\pm 2°C) (ambiente) por dois meses apresentam embriões e células embrionárias pouco reagentes para proteínas, devido a degeneração destas estruturas. Observa-se ausência do suspensor, devido à falta de reação com o produto químico (Fig. 4A). Em quatro meses, as sementes mostram a testa, embrião e células embrionárias reagentes para proteínas. Observa-se ainda degeneração da estrutura do embrião e suspensor, pela falta de reação com CBB (Fig. 4B). Após seis meses, verifica-se semente com embrião e células embrionárias reagentes para proteínas. Ainda é verificado degeneração do embrião e ausência do suspensor, devido à intensidade menor ou ausência de reação das células com o produto (Fig. 4C). Em sementes armazenadas em temperatura de -20°C (freezer) após dois meses, foram evidenciadas pela reação com CBB as estruturas do embrião e células embrionárias com núcleos proeminentes, ainda foi observada a ausência da estrutura do suspensor pela falta de reação com CBB (Fig. 4D). Em quatro meses, as sementes mostram embrião e células embrionárias reagentes para proteínas. Percebe-se embrião em degeneração e ausência do suspensor, por conta da menor intensidade ou ausência de reação das células com o produto (Fig. 4E). Após seis meses, observa-se semente com embrião em degeneração, enquanto as células embrionárias e do suspensor se mostram menos reagentes ao produto. Percebe-se ainda rompimento da testa (Fig. 4F). Para as sementes armazenadas na temperatura de -80°C (ultra freezer) por dois e quatro meses observa-se através da reação com CBB as estruturas do embrião, das células embrionárias e células do suspensor. As células embrionárias apresentam núcleos proeminentes por conta da intensa reação com o produto químico (Fig. 4G-H). Após seis meses, é possível observar a degeneração do embrião e das células embrionárias,

evidenciadas pela ausência de reação com CBB (Fig. 4I). Sementes armazenadas em temperatura de -196°C (criopreservação) por dois e quatro meses mostram embrião, células embrionárias e células do suspensor reagentes para proteínas. Nota-se a degeneração do embrião e das células embrionárias, devido à falta de reação com CBB (Fig. 4J-K). Em seis meses, é verificada a degeneração do embrião e das células embrionárias, percebe-se ainda a ausência do suspensor, devido a menor intensidade ou ausência de reação das células com o produto (Fig. 4L).

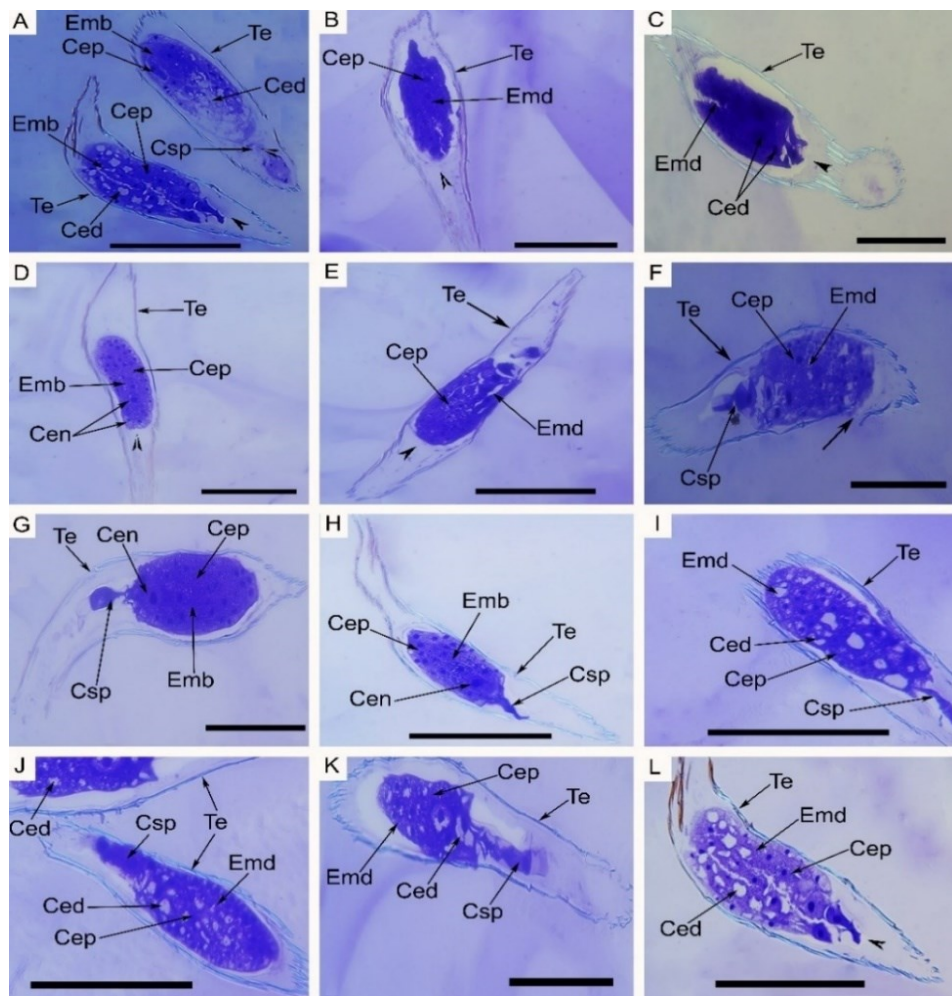


Figura 4 Microscopia de luz e análise histoquímica com CBB de sementes de *Cattleya intermedia* submetidas a diferentes temperaturas e períodos de armazenamento. **Temperatura de $25 (\pm 2^{\circ}\text{C})$:** **A. (dois meses)** Sementes mostrando embriões e células embrionárias pouco reagentes para proteínas. Ponta de seta indica ausência do suspensor. **B. (quatro meses)** Semente evidenciado testa, embrião e células embrionárias reagentes para proteínas. Percebe-se a degeneração do embrião e ausência do suspensor (ponta de seta). **C. (seis meses)** Semente com embrião e células embrionárias reagentes para proteínas. Pode-se perceber a degeneração do embrião e ausência do suspensor (ponta de seta). **Temperatura de -20°C :** **D. (dois meses)** Sementes mostrando embrião e células embrionárias com núcleos proeminentes evidenciadas pela reação com CBB. Ponta de seta indica ausência do suspensor pela falta de reação com o produto. **E. (quatro meses)** Semente mostrando embrião e células embrionárias reagentes para proteínas. Percebe-se embrião em degeneração e ausência do suspensor (ponta de seta). **F. (seis meses)** Pode-se observar semente com embrião em degeneração, células embrionárias e células do suspensor pouco reagentes para proteínas. Observa-se rompimento da testa (seta). **Temperatura de -80°C :** **G. (dois meses)** Semente evidenciando embrião, células embrionárias e células do suspensor reagentes para proteínas.

Observa-se células embrionárias com núcleos proeminentes evidenciadas pela reação com CBB. **H. (quatro meses)** Semente mostrando embrião, células embrionárias e células do suspensor reagentes para proteínas. Pode-se observar células embrionárias com núcleos proeminentes evidenciadas pela reação com CBB. **I. (seis meses)** Sementes apresentando embrião, células embrionárias e células do suspensor reagentes para proteínas. Observa-se a degeneração do embrião e das células embrionárias, evidenciadas pela ausência de reação com o produto químico. **Temperatura de -196°C: J. (dois meses)** Sementes mostrando embrião, células embrionárias e células do suspensor reagentes para proteínas. Percebe-se degeneração do embrião e das células embrionárias, devido à falta de reação com CBB. **K. (quatro meses)** Semente evidenciado embrião, células embrionárias e células do suspensor reagentes para proteínas. Observa-se a degeneração do embrião e das células embrionárias, devido à ausência de reação com o produto químico. **L. (seis meses)** Semente mostrando embrião e células embrionárias reagentes para proteínas. Percebe-se a degeneração do embrião e das células embrionárias, evidenciadas pela falta de reação com CBB. Ponta de seta indica ausência do suspensor. Ced, células embrionárias em degeneração; Cen, células embrionárias com núcleos proeminentes; Cep, células embrionárias reagentes para proteínas; Csp, células do suspensor reagentes para proteínas; Emb, embrião; Emd, embrião em degeneração; Te, testa. Barra de escalas-200 µm.

6.3.5 Análise histoquímica com sudan IV

Nas figuras abaixo, é possível verificar a análise histoquímica com sudan IV em sementes de *C. intermedia* submetidas a diferentes temperaturas e períodos de armazenamento. Sementes armazenadas em temperatura de 25 ($\pm 2^\circ\text{C}$) (ambiente) evidenciam a testa, a extremidade micropilar e calazal, porém, observa-se ausência de reação com sudan IV na região embrionária destas sementes, sendo verificado para as sementes armazenadas em dois (Fig. 5A), quatro (Fig. 5B) e seis meses de armazenamento (Fig. 5C). Em sementes armazenadas em temperatura de -20°C (freezer) por dois meses, observam-se sementes com o embrião reagentes para o sudan IV e ausência do suspensor, devido à falta de reação com o produto químico. Percebe-se semente com embrião pouco reagente ao sudan IV (Fig. 5D). Em quatro meses a semente apresenta o embrião e as células embrionárias reagentes ao sudan IV, porém observa-se degeneração destas estruturas, devido à ausência de reação com o produto químico (Fig. 5E). Após seis meses, observa-se semente com o embrião reagente ao produto, porém as células embrionárias evidenciam degeneração, por conta da ausência de reação com sudan IV. Verifica-se ainda semente com total ausência de reação com sudan IV na região embrionária (Fig. 5F). Nas sementes armazenadas em temperatura de -80°C (ultra freezer) durante dois meses percebe-se semente com ausência de reação ao sudan IV e semente com o embrião e as células do suspensor reagentes ao produto químico (Fig. 5G). Após quatro meses, é evidenciada a reação ao sudan IV no embrião e nas células do suspensor (Fig. 5H). Em seis meses, a degeneração das células embrionárias é percebida, devido à falta de reação com o produto químico (Fig. 5I). Sementes armazenadas na temperatura de -196°C (criopreservação) por dois meses evidenciam a estrutura do embrião e suspensor reagentes ao sudan IV (Fig. 5J). Em quatro meses, são observadas sementes com embrião reagente ao sudan IV e o suspensor pouco reagente ao

produto, evidenciando a degeneração. Ainda se verifica semente com total ausência de reação ao sudan IV no embrião (Fig. 5K). Após seis meses, observa-se semente com embrião reagente ao sudan IV, porém as células embrionárias estão em degeneração, pela falta de 5L).

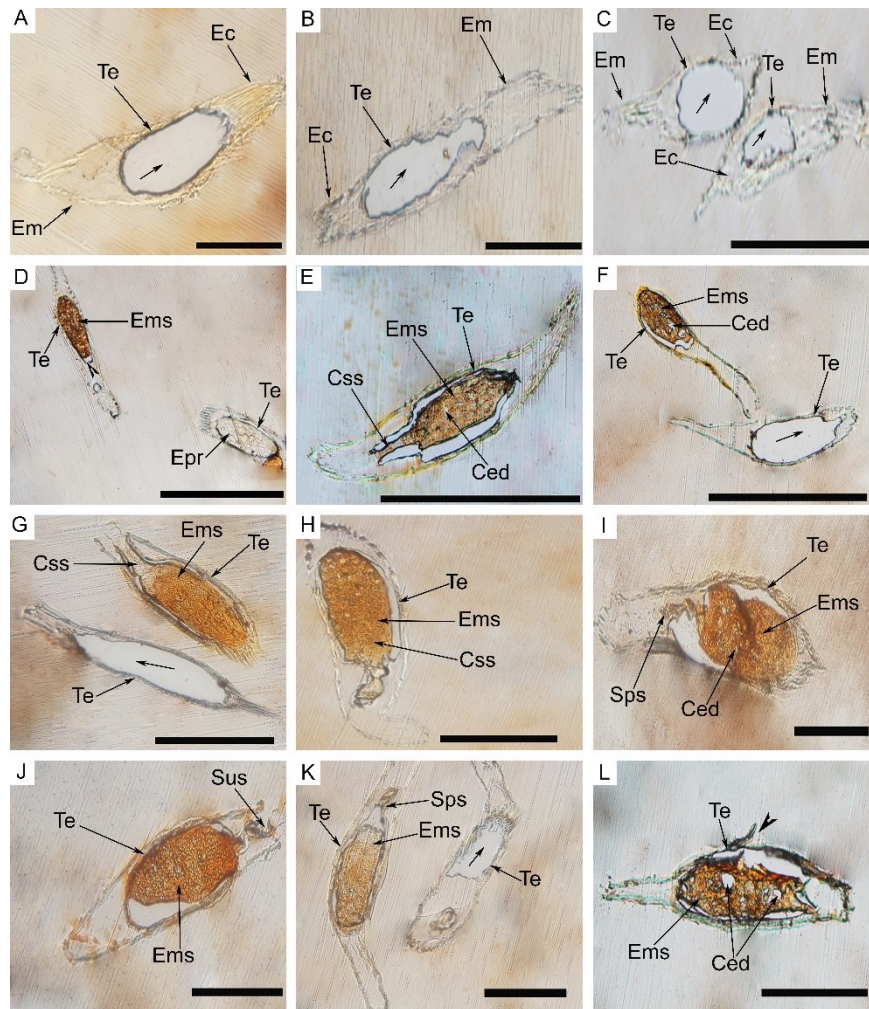


Figura 5 Microscopia de luz e análise histoquímica com Sudan IV de sementes de *Cattleya intermedia* submetidas a diferentes temperaturas e períodos de armazenamento. **Temperatura de 25 (\pm 2°C): A. (dois meses)** Sementes apresentando testa, extremidade micropilar e calazal. A seta indica ausência de reação com sudan IV. **B. (quatro meses)** Semente mostrando a testa, a extremidade micropilar e calazal, observa-se ausência de reação com sudan IV (seta). **C. (seis meses)** Sementes apresentando testa, extremidade micropilar e calazal. Setas indicam ausência de reação com sudan IV. **Temperatura de -20°C: D. (dois meses)** Observa-se à esquerda semente evidenciado embrião reagente para sudan IV. Percebe-se ausência do suspensor (ponta de seta). À direita observa-se semente com embrião pouco reagente ao sudan IV devido à falta de reação com o produto químico. **E. (quatro meses)** Semente evidenciando embrião e células do suspensor reagentes para sudan IV. Percebe-se células embrionárias em degeneração, pela ausência de reação com o produto químico. **F. (seis meses)** Observa-se à esquerda semente com embrião reagente para sudan IV. As células embrionárias evidenciam degeneração pela ausência de reação com sudan IV. À direita percebe-se semente com ausência de reação ao sudan IV. **Temperatura de -80°C: G. (dois meses)** À esquerda observa-se semente com ausência de reação para sudan IV. À direita percebe-se semente evidenciando embrião e as células do suspensor reagentes ao sudan IV. **H. (quatro meses)** Semente evidenciando reação com sudan IV no embrião e nas células do suspensor. **I. (seis meses)** Semente mostrando embrião e suspensor reagentes para sudan IV. Pode-se perceber degeneração das células embrionárias, devido à falta de reação com o produto químico. **Temperatura -196°C: J. (dois meses)** Semente mostrando embrião e suspensor reagentes ao sudan IV. **K. (quatro meses)** À esquerda semente evidenciando o embrião reagente ao sudan IV e suspensor pouco reagente para sudan IV. À direita, percebe-se semente com ausência de reação ao sudan IV. **L.**

(seis meses) Observa-se semente com embrião reagente para sudan IV e as células embrionárias em degeneração, pela falta de reação com o produto químico. Percebe-se a estrutura da testa danificada (ponta de seta). Ced, células embrionárias em degeneração; Css, células do suspensor reagentes para sudan IV; Ec, extremidade calazal; Em, extremidade micropilar; Ems, embrião reagente para sudan IV; Epr, embrião pouco reagente para sudan IV; Sps, suspensor pouco reagente para sudan IV; Sus, suspensor; Te, testa. Barra de escala: **A, B, G, H, I, J, K**- 200 μm ; **C, D, E, F, L**- 500 μm .

6.3.6 Análise histoquímica com ácido periódico de Schiff (PAS)

Na figura 6 é possível observar a análise histoquímica com PAS de sementes de *C. intermedia* submetidas a diferentes temperaturas e períodos de armazenamento. Sementes armazenadas em temperatura de 25 ($\pm 2^\circ\text{C}$) (ambiente) após dois meses mostram reação ao PAS nas estruturas da testa, células da testa, embrião, células embrionárias e células do suspensor (Fig. 6A). Em quatro meses nota-se ausência do suspenso, devido à ausência de reação com PAS (Fig. 6B), enquanto em seis meses, percebe-se a degeneração das células do suspensor, devido à ausência de reação com o corante (Fig. 6C). Na temperatura de -20°C (freezer) após dois meses as sementes evidenciam a testa, embrião, células embrionárias e células do suspensor, devido à reação com o corante. Percebe-se alterações nas células embrionárias, estas evidenciadas através da reação com PAS (Fig. 6D). Em quatro meses, observa-se semente com testa reagente, enquanto o embrião e as células embrionárias apresentam pouca reação ao PAS, ainda se observa alterações nas células do suspensor evidenciadas pela reação com o corante (Fig. 6E). Após seis meses, as sementes mostram diferentes intensidades de reação ao PAS, percebe-se testa reagente e as células embrionárias e do suspensor pouco reagentes ao produto, evidenciando degeneração destas estruturas. As células do suspensor apresentam alterações evidenciadas pela reação ao PAS (Fig. 6F). As sementes armazenadas em -80°C (ultra freezer) após dois meses mostram diferentes intensidades de reação com PAS nas estruturas do embrião e das células embrionárias (Fig. 6G). Em quatro meses, essas sementes apresentaram pouca reação ao PAS na estrutura do embrião e nas células embrionárias. Foi possível verificar alterações nas células do suspensor, estas evidenciadas pela reação ao PAS (Fig. 6H). Após seis meses, as sementes evidenciam diferentes intensidades de reação ao PAS em estruturas do embrião e das células embrionárias, além de alterações nas células do embrião, devido à menor reação com o corante, indicando desta forma a degeneração dessas células (Fig. 6I). Sementes armazenadas em temperatura de -196°C (criopreservação) durante dois meses mostraram o embrião, as células embrionárias e células do suspensor reagentes ao PAS, observa-se alterações nas células do suspensor (Fig. 6J). Em quatro meses, as sementes exibem reação com PAS no embrião, nas células

embrionárias e nas células do suspensor, ocorrendo ainda alterações nas células embrionárias e ausência do suspensor, devido à pouca reação ou a falta de reação com PAS (Fig. 6K). Após seis meses, as sementes mostram diferentes intensidades de reação ao PAS para as estruturas do embrião e das células embrionárias, o que evidencia a sua degeneração. Observa-se alterações nas células embrionárias e ausência do suspensor, pela falta ou pouca reação com o corante (Fig. 6L).

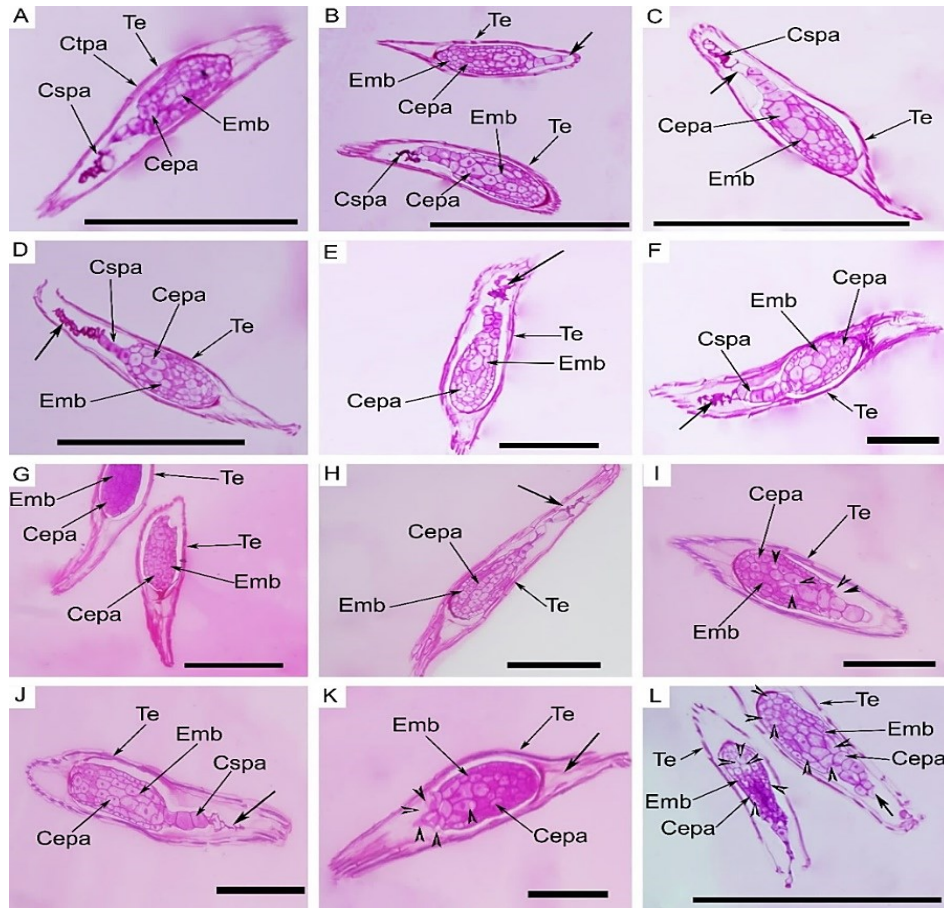


Figura 6 Microscopia de luz e análise histoquímica com PAS de sementes de *Cattleya intermedia* submetidas a diferentes temperaturas e períodos de armazenamento. **Temperatura de 25 ($\pm 2^\circ\text{C}$):** **A. (dois meses)** Semente evidenciando a reação ao PAS nas estruturas da testa, células da testa, embrião, células embrionárias e células do suspensor. **B. (quatro meses)** Observa-se sementes mostrando a testa, embrião, células embrionárias e células do suspensor evidenciadas pela reação com PAS. A seta indica ausência de reação com PAS no suspensor. **C. (seis meses)** Semente mostrando a testa, embrião, células embrionárias e células do suspensor reagentes ao PAS. Pode-se perceber a ausência de reação com as células do suspensor, evidenciado sua degeneração (seta). **Temperatura de -20°C :** **D. (dois meses)** Semente evidenciando a testa, embrião, células embrionárias e células do suspensor reagentes ao PAS. As células do suspensor apresentam alterações evidenciadas pela reação ao PAS (seta). **E. (quatro meses)** Semente evidenciando testa reagente e embrião e células embrionárias pouco reagentes ao PAS. Pode-se observar alterações nas células do suspensor evidenciadas pela reação com o corante (seta). **F. (seis meses)** Semente mostrando diferentes intensidades de reação com PAS, observa-se testa reagente e o embrião e as células embrionárias e do suspensor pouco reagente ao PAS. Pode-se observar alterações nas células do suspensor reagentes ao PAS (seta). **Temperatura de -80°C :** **G. (dois meses)** Sementes mostrando diferentes intensidades de reação no embrião e nas células embrionárias com PAS. **H. (quatro meses)** Semente evidenciando embrião e células embrionárias pouco reagentes ao PAS. Percebe-se alterações nas células do suspensor evidenciadas pela reação com o corante (seta). **I. (seis meses)** Semente mostrando diferentes intensidades de reação no embrião e nas células embrionárias com PAS. Pode-se observar alterações nas células do embrião, devido a menor reação

com PAS (pontas de seta). **Temperatura de -196°C: J. (dois meses)** Semente mostrando embrião, células embrionárias e células do suspensor reagentes ao PAS. Observa-se alterações nas células do suspensor reagentes ao corante (seta). **K. (quatro meses)** Semente mostrando testa, embrião e células embrionárias reagentes ao PAS. Pode-se observar alterações nas células embrionárias (pontas de seta) devido à falta de reação com o corante e ausência de reação ao PAS no suspensor (seta). **L. (seis meses)** Sementes mostrando diferentes intensidades de reação com PAS no embrião e células embrionárias, evidenciando sua degeneração. Percebe-se alterações nas células embrionárias (pontas de seta), devido à pouca reação com o corante e semente com ausência de reação ao PAS no suspensor (seta). Cspa, células do suspensor reagentes ao PAS; Ctpa, célula da testa reagente ao PAS; Emb, embrião; PAS, ácido periódico de Schiff; Te, testa. Barra de escala: **A, B, C, D, L-** 500 µm; **E, F, G, H, I, J, K-** 200 µm.

6.4 Discussão

6.4.1 Caracterização de sementes não submetidas ao armazenamento

As estruturas verificadas em sementes recém beneficiadas de *C. intermedia* são consideradas essenciais para garantir a conservação e sobrevivência das espécies. Sementes dessa família são reconhecidas pelo seu minúsculo tamanho, que varia de 0,05 a 6 mm e geralmente possuem uma testa, o qual é considerada uma estrutura de revestimento e que tem a função de proteger o embrião (Ziegler 1981). No embrião das sementes de *C. intermedia* foi verificado um suspensor ligado a este, esta estrutura pode estar presente em algumas famílias de orquídeas e quando existente desempenha um papel fundamental para o desenvolvimento embrionário, facilitando a movimentação dos nutrientes presentes no tecido materno para o embrião (Yeung 2017). Segundo este autor os embriões maduros de orquídeas apresentam em sua estrutura reservas de proteínas e lipídios, mas estas são consideradas mínimas para promover a germinação destas sementes em ambiente natural. Yeung (2017) enfatiza que eventualmente pode ocorrer a presença de grãos de amido, mas até o momento ainda não se sabe como estes produtos influenciam a germinação assimbiótica. Todas essas reservas foram observadas no embrião das sementes de *C. intermedia* recém beneficiadas, além disso, a histoquímica com PAS detectou a presença de celulose na parede celular dessas sementes, de acordo com Mateu et al. (2014) a parede celular tem como base nanocompostos de microfibrilas de celulose.

A principal função da reserva de proteína é o armazenamento dos nutrientes como o nitrogênio e o enxofre, estes são fundamentais para a síntese de novas proteínas, ácidos nucleicos e compostos secundários, que são indispensáveis para o crescimento das plântulas (Lima et al. 2008). Pavithra et al. (2014) afirmam que as proteínas estão associadas às reservas lipídicas a fim de prevenir a coalescência causada pela ação de enzimas hidrolíticas. Enquanto as reservas lipídicas, estão acumuladas em corpos lipídicos e são utilizadas principalmente

como fonte de energia durante o processo inicial da germinação e crescimento do embrião (Somerville et al. 2000; Graham, 2008).

6.4.2 Desidratação das sementes durante o armazenamento

O dano por desidratação observado em sementes de *C. intermedia* armazenadas nas diferentes temperaturas ao longo dos diferentes períodos de armazenamento causam a perda da viabilidade das sementes, tornando-as inviáveis. Berjak e Pammenter (2003) descrevem que a perda da viabilidade é uma das principais consequências promovidas por este dano, isso ocorre por conta do metabolismo desequilibrado e dos vários danos que são observados nas membranas celulares por conta da desidratação. Oliveira e Valio (1994) ao estudar o armazenamento de sementes de *Hancornia speciosa* constataram perda da viabilidade por consequência de danos evidenciados nas membranas celulares. Os autores descrevem que estes danos foram causados principalmente pela ocorrência da desidratação observadas nas sementes.

No capítulo anterior, foi verificado que as sementes de *C. intermedia* também apresentaram perda da viabilidade quando armazenadas em diferentes temperaturas e períodos de armazenamento. Porém, as maiores reduções foram observadas em sementes mantidas nas temperaturas de 25 ($\pm 2^\circ\text{C}$) (ambiente) e -20°C (freezer). Através das imagens da microscopia de varredura pode-se observar que as sementes mantidas nessas condições foram as que evidenciaram maior ocorrência deste dano e fundamentam os resultados obtidos descritos anteriormente.

A desidratação presente nas sementes também provoca uma série de alterações nos componentes de reservas, sendo que um dos primeiros sintomas observados é a ocorrência de variações nas reservas lipídicas (Navari- Izzo et al. 1989, 1995).

6.4.3 Alterações nas reservas lipídicas das sementes

Neste trabalho, foram evidenciadas variações nas reservas lipídicas presentes no embrião das sementes de *C. intermedia*. Para as sementes mantidas na temperatura de 25 ($\pm 2^\circ\text{C}$) (ambiente) foram observadas ausência de reação com o reagente sudan IV, evidenciando uma maior degradação da reserva lipídica quando submetida a essa condição. Por outro lado, as sementes que foram mantidas nas temperaturas de -20°C (freezer), -80°C (ultra freezer) e -196°C (criopreservação) apresentaram embriões reagentes ao sudan IV, porém, ao longo dos diferentes períodos foram observadas menor intensidade ou ausência de reação das células com

o produto químico, por conta da ocorrência da degeneração que estava acontecendo na estrutura do embrião e das células embrionárias, e conseqüentemente, isto promoveu alterações nas reservas lipídicas dessas sementes. Abreu et al. (2012) ao estudar o armazenamento de sementes de girassol também observou reduções nos teores de reservas lipídicas, assim como neste presente trabalho.

Dussert et al. (2001) afirma que a presença das reservas lipídicas nas sementes está relacionada a sobrevivência das mesmas durante a exposição a temperaturas muito baixas, este fato pode estar relacionado com a maior sobrevivência destas sementes durante essas condições, visto que, no capítulo anterior foi verificado que as sementes mantidas em condições de baixa temperatura foram as que apresentaram maiores percentuais de viabilidade e germinação, principalmente aquelas mantidas em temperatura de -80°C (ultra freezer) durante os períodos de dois e quatro meses, sendo que nesta condição foi verificada melhor conservação das reservas lipídicas presentes no embrião das sementes. Enquanto as que foram submetidas a $25 (\pm 2^{\circ}\text{C})$ sofreram redução significativa da viabilidade e da capacidade germinativa ao longo do tempo, perdendo por completo a germinação a partir dos seis meses de armazenamento. Isso poderia ser explicado pela falta deste componente de reserva na semente, pois como vimos anteriormente, essa reserva se faz necessária para garantir energia durante o processo de germinação e crescimento do embrião.

Koutroubas et al. (2000) afirma que, quando as sementes são armazenadas em condições de temperatura ambiente, as reservas lipídicas são as que mais sofrem com as variações em seu teor, sendo o lipídio considerado o constituinte mais suscetível ao processo degenerativo durante a etapa do armazenamento. Tal ocorrência também foi constatada neste trabalho para as sementes de *C. intermedia* mantidas a $25 (\pm 2^{\circ}\text{C})$.

6.4.4 Alterações nas reservas proteicas das sementes

No embrião das sementes de *C. intermedia* também foram evidenciadas variações nas reservas de proteínas, estas observadas principalmente quando o embrião e as células embrionárias apresentavam indício de degeneração em suas estruturas. Abbade et al. (2014) ao estudar o armazenamento de sementes de ipê por diferentes períodos de armazenamento verificou redução no conteúdo das proteínas, este fato também foi observado no presente estudo para as sementes de *C. intermedia* e estão em conformidade com estes autores.

6.4.5 Alterações em carboidratos presentes nas sementes

Outra forma de sobrevivência relacionada ao uso da exposição das sementes em temperaturas baixas está correlacionada com a redução do conteúdo de amido contido nas sementes, porém, ainda é pouco conhecido as informações acerca deste assunto (Kaplan et al. 2006). Para as sementes recém beneficiadas de *C. intermedia* foram verificadas reservas amiláceas contidas no interior do embrião, entretanto, após o armazenamento nas diferentes temperaturas e períodos de armazenamento não foi possível verificar a sua presença. De acordo com Yeung et al. (2017) os grânulos de amido que ocorrem nas sementes são substituídos por reservas de proteínas e corpos lipídicos, por isso que no embrião das sementes de orquídeas esses grânulos são considerados raros. Essa ausência observada para as sementes submetidas a diferentes condições de armazenamento pode estar correlacionada ao que foi posto por estes autores, visto que, nas sementes recém beneficiadas esta reserva se fez presente.

Outra modificação observada nas sementes está associada a parede celular, visto que isso, pode causar várias alterações nos polissacarídeos que estão presentes nessa estrutura. Porém, na literatura ainda existem poucos estudos relacionados a cerca deste tema, e de acordo com Vicré et al. (2004) e Moore et al. (2006) a principal consequência da desidratação é o desdobramento entre as paredes, o que resulta na compactação das células.

6.4.6 Modificações em compostos formadores do embrião e do suspensor e seus efeitos sobre a capacidade de originar novas plântulas após o armazenamento

Neste presente estudo foi observado que as sementes de *C. intermedia* armazenadas em temperatura de -80°C (ultra freezer) pelo período de dois e quatro meses se mostraram mais eficientes em relação a conservação das reservas contidas no interior do embrião. Segundo Shibata et al. (2012), sementes que apresentam maior teor de proteínas em seu interior são consideradas mais vigorosas. Essas observações estão em concordância com os dados relacionados a qualidade das sementes apresentados no capítulo anterior, visto que, essa temperatura de armazenamento proporcionou os melhores resultados de viabilidade, germinação e desenvolvimento de parâmetros morfológicos das plântulas oriundas dessas sementes armazenadas, demonstrando sua maior qualidade fisiológica.

Sementes de *C. intermedia* providas do armazenamento em diferentes condições apresentaram modificações de estruturas consideradas essenciais para a ocorrência do processo

germinativo e para a formação de novas plântulas. Vieira et al. (1994) afirmam que o envelhecimento que ocorre nas sementes durante o armazenamento provoca alterações degenerativas, principalmente nas estruturas internas que compõem as sementes, e isso contribui para um descontrole metabólico, fazendo com que ocorra a impossibilidade da troca de água e solutos entre as células e o meio exterior, e como consequência essas sementes acabam perdendo o poder germinativo.

Durante os diferentes tratamentos de armazenamento, foi verificado que as sementes de *C. intermedia* apresentaram degeneração de estruturas das células embrionárias e do embrião. Oliveira et al. (2011) sugerem a importância de estudar essas modificações que ocorrem na estrutura embrionária logo após o armazenamento, visto que, estes dados podem trazer informações essenciais para garantir a melhor conservação da qualidade das sementes e produção de mudas. Pesquisas relacionadas a histoquímica têm comprovado a importância das substâncias de reservas contidas no embrião, em especial, para as fases de germinação e a formação de novas plântulas, pois quanto maior o conteúdo de reservas existentes nas sementes, a plântula originada a partir desta terá um maior vigor (Carvalho e Nakagawa 2000).

Os dados aqui apresentados mostram que a alta temperatura em conjunto com a alta umidade das sementes durante a etapa do armazenamento provocam alterações degenerativas nas estruturas internas das sementes. Sementes de *C. intermedia* foram armazenadas com umidade inicial acima de 30%, e neste caso, este processo ocorre de forma mais intensa, sendo que os primeiros sinais observados estão relacionados com a perda da integridade das membranas celulares, ainda pode-se observar o esgotamento de reservas, as alterações na composição química, a peroxidação de lipídios e danos celulares (Delouche e Baskin 1973; Vieira et al. 1994; Zonta et al. 2014).

Storek et al. (2005) afirmam que, quando as sementes são submetidas a diferentes condições de armazenamento a composição química presente no embrião é comprometida. Tal ocorrência foi constatada neste trabalho para as sementes de *C. intermedia*, onde foram observadas nas diferentes condições de armazenamento alterações no acúmulo de reservas, dado que, dependendo das condições do ambiente, do grau de umidade e das características da própria semente, pode ocorrer de forma mais rápida ou lenta, o que irá afetar ligeiramente o processo de produção de mudas (Vieira et al. 2001; Souza et al. 2011; Walters et al. 2010).

Trabalhos relacionados com sementes ortodoxas revelam que reduções nos teores de amido e proteínas estão associados a menor germinação e vigor das sementes (Henning et al.

2010). E que dentre as consequências envolvidas no esgotamento de reservas, podem ser visualizadas o aumento do número de plântulas consideradas anormais (Nedel 2006). No capítulo anterior, foram observadas alterações em plântulas de *C. intermedia* originadas a partir das sementes submetidas a diferentes condições de armazenamento, e que essas anormalidades podem estar relacionadas com a redução do acúmulo das reservas presentes no embrião. Resultados semelhantes também foram encontrados por Strenske et al. (2017) ao estudar o armazenamento de sementes de quinoa, estes autores observaram o aumento da ocorrência de plântulas consideradas anormais, devido ao fato da ocorrência de alterações nos compostos de reservas, principalmente aqueles relacionados as proteínas, visto que, esta reserva é indispensável para o crescimento das plântulas.

Ainda para as sementes de *C. intermedia* armazenadas em diferentes condições de temperatura foi observado ao longo dos diferentes períodos de armazenamento a ausência da estrutura do suspensor ou este quando presente estava em processo de degeneração. De acordo com Yeung et al. 2018 ainda não se sabe como ocorre a absorção dos nutrientes pelo embrião sem a presença da estrutura do suspensor, sendo que a principal função dessa estrutura é contribuir com a entrada de nutrientes para o embrião, a fim de garantir maior viabilidade e germinação das sementes.

6.5 Conclusões

Sementes da espécie *C. intermedia* têm formato filiforme, com uma testa, um suspensor e um embrião, este contém os principais componentes de reserva que são consideradas mínimas para promover o fenômeno de germinação das mesmas na natureza.

Após o processo de armazenamento das sementes nas diferentes temperaturas e períodos de armazenamento foi evidenciado dano por desidratação. Este dano foi responsável pela perda da viabilidade das sementes. Além de causar alterações nas principais reservas, por conta da degeneração de estruturas consideradas essenciais para garantir a qualidade tanto das sementes como das plântulas originadas a partir destas.

O armazenamento em temperatura de -80°C (ultra freezer) durante o período de dois e quatro meses se mostrou eficiente para a conservação das principais estruturas internas das sementes, corroborando com os dados encontrados no capítulo anterior sobre a qualidade de sementes e plântulas originadas a partir destas durante esta condição.

Este trabalho forneceu informações importantes para melhor entendimento dos dados gerados no capítulo anterior, sendo um dos primeiros trabalhos que relatam alterações decorrentes do armazenamento de sementes de orquídea da espécie *C. intermedia* e fornece bases para que mais estudos relacionados a este tema sejam realizados.

6.6 Agradecimentos

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de nível de mestrado ao primeiro autor e pelo financiamento dessa pesquisa, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), ao Orquidário Carlos Gomes pelas sementes cedidas para realização deste experimento e aos laboratórios: Laboratório de Núcleo de Pesquisas em Biotecnologia e Desenvolvimento Vegetal (NPBV), Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal (LFDGV), Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) e ao Laboratório Multiusuários de Estudos em Biologia (LAMEB) pela disponibilização de equipamentos, reagentes e infraestrutura utilizados.

6.7 Referências

- Abbade LC, Takaki M (2014) Biochemical and physiological changes of *Tabebuia roseo alba* (Ridl.) Sandwith (Bignoniaceae) seeds under storage. *Journal of Seed Science*, 36(1): 100-107. doi: 10.1590/S2317-15372014000100013.
- Abreu LAS, Carvalho MLM, Pinto CAG, Kataoka VY, Silva TTA (2012) Deterioration of sunflower seeds during storage. *Journal of Seed Science*, 35(2): 240-247. doi: 10.1590/S2317-15372013000200015.
- Alvarez-Pardo VM, Ferreira AG, Nunes, VF (2006) Métodos de desinfestação de sementes para o cultivo *in vitro* de orquídeas epífitas do Sul do Brasil, *Horticultura Brasileira*, 24: 217-220. doi: 10.1590/S0102-05362006000200019.
- Arditti J (1992) *Fundamentals of orchid biology*. New York, John Wiley & Sons: 898 p
- Barbedo CJ, Santos Júnior NA (2018) *Sementes do Brasil: produção e tecnologia para espécies da flora brasileira*. São Paulo: Instituto de Botânica
- Becerra-Vázquez AG, Sánchez-Nieto S, Coates R, Flores-Ortiz CM, Orozco-Segovia (2018) Seed longevity of five tropical species from South-eastern Mexico: changes in seed germination during storage. *Tropical Conservation Science, Mexico*, 11(1): 1-17. doi: 10.1177/1940082918779489.

- Berjak P, Pammenter NW (2003) Chapter 4: Orthodox and Recalcitrant Seeds. In: USDA Forest Service's\Reforestation, Nurseries e Genetics Resources. Tropical Tree Seed Manual. 137-147
- Bewley JD, Black M (1994) Seeds: physiology of development and germination. 2. ed. New York: Plenum Press, 445p
- Bewley JD, Bradford KJ, Hilhorst HWM, Nonogaki H (2013) Seeds: Physiology of development, germination and dormancy, 3rd ed. Springer, New York
- Brasil (2009) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para Análise de Sementes. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, 398p
- Carvalho NM, Nakagawa J (2000) Sementes: ciência, tecnologia e produção. 4.ed. Jaboticabal: FUNEP. 588p
- CNC Flora. *Cattleya intermedia* in Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012.2. Centro Nacional de Conservação da Flora (2012). Disponível em: <http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Cattleya_intermedia>. Acesso em: 29 outubro 2019
- Colville L, Marks TR, Pritchard HW, Custodio CC, Machado-Neto NB (2016) Development of a reliable GC-MS method for fatty acid profiling using direct transesterification of minimal quantities of microscopic orchid seeds. Seed Sci Res. 26(1):84–89. doi: 10.1017/S0960258515000367.
- Delouche JC, Baskin CC (1973) Accelerated aging techniques for predicting the relative storability of seeds lots. Seed Science and Technology 2: 427-452
- Dussert S, Chabrillange N, Rocquelin G, Engelmann F, Lopez M, Hamonn S (2001) Tolerance of coffee (*Coffea* spp.) seeds to ultra-low temperature exposure in relation to calorimetric properties of tissue water, lipid composition, and cooling procedure. Physiologia Plantarum 112: 495-504. doi: 10.1034/j.1399-3054.2001.1120406.x.
- Fanan S, Medina PF, Camargo MBP, Ramos NP (2009) Influência da colheita e do armazenamento na qualidade fisiológica de sementes de mamona. Revista Brasileira de Sementes, 31: 150-159. doi: 10.1590/S0101-31222009000100017.
- Felix FC, Pádua GVG, Araújo FS, Ferrari CS, Pacheco MV (2017) Armazenamento de sementes de *Pritchardia pacifica*. Revista de Ciência Agrárias, Lisboa, 40(1): 69-78 doi: 10.19084/RCA16043.
- Ferreira CA (2000) Recuperação de áreas degradadas. Informe Agropecuário 21: 127-130
- Flora do Brasil em construção (2020) Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>. Acesso em: 03 fev. 2020

- Gallão MI, Damasceno LF, De Brito ES (2006) Avaliação química e estrutural da semente de moringa. *Revista Ciência Agronômica*, 37: 106-109
- Galdiano Junior RF, Mantovani C, Faria RT, Lemos EGM (2013) Concentrações de sacarose no desenvolvimento *in vitro* e aclimatação de *Cattleya loddigesii* Lindley. *Semina: Ciências Agrárias*, 34: 583-592. doi: 10.5433/1679-0359.2013v34n2p583.
- Gonçalves RC, Almeida MP, Gonçalves NR, Oliveira Santos LR (2018) Temperatura e armazenamento em sementes de soja. 2018. Disponível em: <<http://maissoja.com.br/temperatura-earmazenamento-em-semente-de-soja/>>. Acesso em: 03 ago 2020
- Graham IA (2008) Seed storage oil mobilization. *Annual Review of Plant Biology*, 59: 115-142. doi: 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092938.
- Hay FR, Probert RJ (2013) Advances in seed conservation of wild plant species: a review of recent research. *Conservation Physiology*, 1:11. doi: 10.1093/conphys/cot030.
- Henning FA, Mertz LM, Junior EAJ, Machado RD, Fiss G, Zimmer PD (2010) Composição química e mobilização de reservas em sementes de soja de alto e baixo vigor. *Bragantia*, Campinas, 69(3): 727-734
- Johansen DA (1940) *Plant microtechnique*. London: McGraw Hill. 523p
- Kaplan F, Sung DY, Guy CL (2006) Roles of β -amylase and starch breakdown during temperatures stress. *Physiologia Plantarum* 126: 120-128. doi: doi.org/10.1111/j.1399-3054.2006.00604.x.
- Koopowitz H (2001) *Orchids and their conservation*. Timber Press, Portland, Oregon
- Koutroubas SD, Papakosta DK, Doitsinis A (2000) Water requirements for castor oil crop (*Ricinus communis* L.) in a Mediterranean climate. *Crop Science*, 40: 33-41. doi: 10.1046/j.1439-037x.2000.00357.x.
- Lima RBS, Gonçalves JFC, Pando SC, Fernandes AV, Santos ALW (2008) Primary metabolite mobilization during germination in rosewood (*Aniba rosaedora* Ducke) seeds. *Revista Árvore*, 32: 19-25. doi: 10.1590/S0100-67622008000100003.
- Lima J, Smiderle O, Oliveira J, Carvalho M (2018) Técnicas de análise de imagem para caracterização da qualidade de sementes de paricarana (*Bowdichia virgilioides* Kunth). *Ciência Florestal*. 28. 1202. doi: 10.5902/1980509833367.
- Mateu BP, Tefke B, Hauser MT, Gierlinger N (2014) Elucidating structural and compositional changes in plant tissues and single cells by Raman spectroscopic imaging. *Research Gate*. 26: 11-14
- McDonald MB (1999) Seed deterioration: physiology, repair and assessment. *Seed Science and Technology*, 27(1): 177-237

- Molvray M, Kores JP (1995) Character analysis of the seed coat in Spiranthoideae with special reference to the Diurideae (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 82: 1443-1453. doi: 10.1002/j.1537-2197.1995.tb12682.x.
- Moore JP, Nguema-Ona E, Chevalier L, Lindsey GC, Brandt WF, Lerouge P, Farrant JM, Driouich A (2006) Response of the leaf cell wall to desiccation in the resurrection plant *Myrothamnus flabellifolius*. *Plant Physiology* 141: 651-662. doi: 10.1104/pp.106.077701.
- Navari-Izzo F, Quartacci MF, Izzo, R (1989) Lipid changes in maize seedlings in response to field water deficits. *Journal of Experimental Botany* 40: 675-680. doi: 10.1093/jxb/40.6.675.
- Navari-Izzo F, Ricci F, Vazzana C, Quartacci, M.F (1995) Unusual composition of thylakoid membranes of the resurrection plant *Boea hygroskopica*: Changes in lipid upon dehydration and rehydration. *Physiologia Plantarum* 94(1): 135-142. doi: 10.1111/j.1399-3054.1995.tb00794.x.
- Nedel JL (2006). Fundamentos da Qualidade de Sementes. In: Peske ST, D'ávila Rosenthal m, Rota GRM (Eds.) *Sementes: fundamentos científicos e tecnológicos*, 1. Ed, Pelotas: UFPel, 94-136p
- Nery MC, Davide AC, Silva EAA, Soares GCM, Nery FC (2014) Classificação fisiológica de sementes florestais quanto a tolerância à dessecação e ao armazenamento. *Cerne*, 20(3): 477-483
- Oliveira LM, Valio IFM (1994) Effects of moisture content on germination of seeds of *Hancornia speciosa* Gom. (Apocynaceae). *Annals of Botany, London*, 9: 91-100
- Oliveira JA, Silva TTA, Von Pinho EVR, Abreu LAS (2011) Secagem e armazenamento de sementes de sorgo com alto e baixo teor de tanino, *Revista Brasileira de Sementes*, 33(4): 699-710. doi: 10.1590/S0101-31222011000400012.
- Pavithra HR, Gowda B, Shivanna MB (2014) Biochemical changes in the composition of developing seeds of *Pongamia pinnata* (L.) Pierre. *Industrial Crops and Products*, 53: 199-208. doi: 10.1016/j.indcrop.2013.12.032.
- Pritchard HW, Pointer LCA, Seaton TP (1999) Interspecific variation in orchid seed longevity in relation to ultra dry storage and cryopreservation. *Lindleyana, Palm Beach*, 14(2): 92-101
- Santos IRI, Salomão IN (2010) *Manual de curadores de germoplasma – vegetal: Criopreservação*. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
- Schmidt ÉC, Pereira B, Santos R, Pontes CLM, Scherner F, Horta PA, Paula MR, Latini A, Ramlov F, Maraschin M, Bouzon Z. L (2012) Alterations in architecture and metabolism induced by ultraviolet radiation-B in the carragenophyte *Chondracanthus teedei* (Rhodophyta, Gigartinales). *Protoplasma* 249:353-367. doi: 10.1007/s00709-011-0286-1.

Shibata M, Coelho CMM, Oliveira LM, Garcia C (2012) Accelerated aging of ipê seeds under controlled conditions of storage. *Revista Brasileira de Sementes*, 34(2): 247-254. doi: 10.1590/S0101-31222012000200009.

Silva da IV, Meira RMSA, Azevedo AA, Euclides RMA (2006) Estratégias anatômicas foliares de treze espécies de Orchidaceae ocorrentes em um campo de altitude no Parque Estadual da Serra do Brigadeiro-MG, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, Belo Horizonte 20: 741-750. doi:10.1590/S0102-33062006000300023.

Silva DG, Carvalho MLM, Nery MC, Oliveira LM, Caldeira CM (2011) Alterações fisiológicas e bioquímicas durante o armazenamento de *Tabebuia serratifolia*, Cerne, Lavras, 17(1): 1-7. doi: 10.1590/S0104-77602011000100001.

Somerville C, Browse J, Jaworski JG, Ohlrogge JB (2000). Lipids. In Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL. *Biochemistry and molecular biology of Plants*. Rockville: Am Soc Plant Physiol, 40: 456-527

Souza V C, de Andrade LA, Cruz FRS, Fabricante JR, Oliveira LSB (2011) Conservação de sementes de marizeiro *Geoffroea spinosa* Jacq. utilizando diferentes embalagens e ambientes. *Ciência Florestal*, 21(1), 93-102

Strenske A, Vasconcelos ES, Egewarth NF, Herzog M, Malavasi MM (2017) Responses of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) seeds stored under different germination temperatures. *Acta Scientiarum Agronomy*, 39(1): 83-88. doi:10.4025/actasciagron.v39i1.30989. doi: 10.4025/actasciagron.v39i1.30989.

Storck CR, Silva LP, Comarella CG (2005) Influência do processamento na composição nutricional de grãos de arroz. *Alimentos e Nutrição*, 16(3): 259-264

Terskikh VV, Zeng Y, Feurtado JÁ, Giblin M, Abrams SR, Kermode SR (2008) Deterioration of western redcedar (*Thuja plicata* Donn ex Dd. Don) seeds: protein oxidation and in vivo NMR monitoring of storage oils. *Journal of Experimental Botany*, 59: 765-777. doi: 10.1093/jxb/erm357.

The Plant List (2020) A working list of all plant species. Disponível em: <<http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Orchidaceae/>>. Acesso em: 03 ago. 2020

Ventrella MC, Almeida AL, Nery LA, Coelho, VPM (2013) Métodos histoquímicos aplicados às sementes, Viçosa- MG, Ed. UFV

Vicré M, Farrant JM, Driouich A (2004) Insights into the cellular mechanisms of desiccation tolerance among angiosperm resurrection plant species. *Plant Cell Environ*, 27: 1329-1340. doi: 10.1111/j.1365-3040.2004.01212.x.

Vieira RD, Carvalho NM, Sander R (1994) Testes de vigor e suas possibilidades de uso. *Teste de vigor em sementes, Jaboticabal*, p 31-47

Vieira AH, Martins EP, Pequeno PL de L, Locatelli M, Souza MG de (2001) Técnicas de produção de sementes florestais. Porto Velho, Embrapa, 1-4p

Walters C, Ballesteros, D, Vertucci V (2010) Structural mechanics of seed deterioration: Standing the test of time. *Plant Science*, 179: 565-573

Yeung EC (2017) A perspective on orchid seed and protocorm development. *Botanical Studies*, 58:1-14. doi: 10.1186/s40529-017-0188-4.

Yeung Edward & Li, Yuan-Yuan & Lee, Yung-I (2018) Understanding Seed and Protocorm Development in Orchids. doi: 10.1007/978-1-4939-7771-0_1.

Ziegler B (1981) Mikromorphologie der Orchideensamen unter Berücksichtigung taxonomischer Aspekte. Tese de doutorado, Ruprecht Karls Universität, Heidelberg

Zonta JB, Araujo EF, Araujo RF, Zonta JH, Dias LAS, Ribeiro PH (2014) Armazenamento de sementes de pinhão manso em diferentes embalagens e ambientes. *Bioscience Journal* 30: 599-608

7 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Através do presente estudo é possível concluir que a temperatura de -80°C (ultra freezer) se mostrou como uma alternativa viável e eficaz tanto para termos de conservação de germoplasma quanto para a retomada do processo de formação de novas plântulas. Neste sentido, recomenda-se que esta temperatura de armazenamento pode ser utilizada para armazenar as sementes da maioria das espécies de orquídeas em banco de sementes, incluindo a espécie *C. intermedia*, devido a melhor conservação dos parâmetros relacionados a qualidade tanto das sementes como das plântulas originadas a partir destas. Este trabalho envolve um dos primeiros relatos sobre a qualidade de sementes e plântulas de orquídeas da espécie *C. intermedia* oriundas de diferentes condições de armazenamento, além de trazer informações relacionadas as alterações morfológicas e anatômicas dessas sementes armazenadas. Logo este trabalho fornece bases para que mais estudos que envolvam a conservação *ex situ* de diferentes espécies sejam realizados.

Como perspectivas de trabalhos futuros será importante estudar diferentes técnicas de armazenamento com sementes desidratadas de *C. intermedia* e outras espécies de orquídeas, pois assim, os danos provocados pelo congelamento, verificado tanto nas sementes como nas plântulas, acredita-se que poderiam ser evitados, pois essas sementes foram armazenadas com umidade inicial superior a 30%. Outro ponto importante visa o estudo epigenético molecular em relação a germinação das sementes mantidas a diferentes temperaturas e períodos de armazenamento, para a melhor compreensão das modificações que ocorrem durante essa etapa.

Outro estudo importante será o de aclimação de plântulas oriundas das diferentes temperaturas de armazenamento, visto que, estudos de aclimação de espécies de orquídeas ainda são considerados escassos e necessários, ainda mais que plântulas que apresentam alterações morfológicas durante o cultivo *in vitro*, como as que foram observadas neste estudo, possuem baixa capacidade de aclimação e isso acaba interferindo no processo de produção de mudas com qualidade.

Desta maneira, esta dissertação concluiu com os objetivos definidos. E ainda com a resolução dessas perguntas teríamos maiores informações e entendimento sobre o processo de conservação *ex situ* de sementes de orquídeas da espécie *Cattleya intermedia*, além daqueles que já foram descritos neste trabalho. Além de permitir a continuidade de novas pesquisas relacionadas a esta área de estudo.