

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**GERMINAÇÃO DE SEMENTES E CONSERVAÇÃO DE  
ORQUÍDEAS NATIVAS DAS AMÉRICAS**

**Suzana Targanski Sajovic Pereira**  
**Engenheira Agrônoma**

**2020**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**GERMINAÇÃO DE SEMENTES E CONSERVAÇÃO DE  
ORQUÍDEAS NATIVAS DAS AMÉRICAS**

**Suzana Targanski Sajovic Pereira**

**Orientadora: Profa. Dra. Kathia Fernandes Lopes Pivetta**

**Coorientador: Prof. PhD Wagner Aparecido Vendrame**

**Coorientador: Prof. Dr. José Carlos Sorgato**

**Tese apresentada à Faculdade de Ciências  
Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de  
Jaboticabal, como parte das exigências para  
a obtenção do título de Doutor em Agronomia  
(Produção Vegetal)**

P436g

Pereira, Suzana Targanski Sajovic

Germinação de sementes e conservação de orquídeas nativas das  
Américas / Suzana Targanski Sajovic Pereira. -- Jaboticabal, 2020  
48 p. : il., tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),  
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientadora: Kathia Fernandes Lopes Pivetta

Coorientador: Wagner Aparecido Vendrame

1. Criopreservação. 2. Fontes de luz. 3. Plantas Meios de cultivo. 4.  
Propagação. 5. Técnicas in vitro. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de  
Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

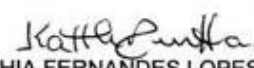
Essa ficha não pode ser modificada.

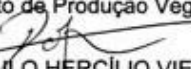
**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

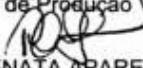
**TÍTULO DA TESE:** GERMINAÇÃO DE SEMENTES E CONSERVAÇÃO DE ORQUÍDEAS NATIVAS DAS AMÉRICAS

**AUTORA:** SUZANA TARGANSKI SAJOVIC PEREIRA  
**ORIENTADORA:** KATHIA FERNANDES LOPES PIVETTA  
**COORDENADOR:** WAGNER APARECIDO VENDRAME  
**COORDENADOR:** JOSÉ CARLOS SORGATO

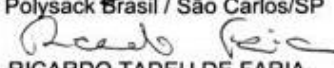
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em AGRONOMIA (PRODUÇÃO VEGETAL), pela Comissão Examinadora:

  
Profa. Dra. KATHIA FERNANDES LOPES PIVETTA  
Departamento de Produção Vegetal (Horticultura) / FCAV / UNESP - Jaboticabal

  
Prof. Dr. PAULO HERCÍLIO VIEGAS RODRIGUES  
Departamento de Produção Vegetal-ESALQ/USP / Piracicaba/SP

  
Profa. Dra. RENATA APARECIDA DE ANDRADE  
Departamento de Produção Vegetal (Horticultura) / FCAV / UNESP - Jaboticabal

  
Pesquisador Dr. GILBERTO ROSTIROLLA BATISTA DE SOUZA  
Ginegar Polysack Brasil / São Carlos/SP

  
Prof. Dr. RICARDO TADEU DE FARIA  
Departamento de Agronomia da UEL / Londrina/PR

Jaboticabal, 05 de março de 2020

## **DADOS CURRICULARES DA AUTORA**

SUZANA TARGANSKI SAJOVIC PEREIRA – Nascida em 05 de fevereiro de 1988, na cidade de Amambai-MS, filha de Eva Rosalia Targanski e Eral Sajovic Pereira. Graduada em Engenharia Agrônômica em 05 de março de 2015 pela Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), Faculdade de Ciências Agrárias (FCA), Dourados-MS. Na graduação foi bolsista de Iniciação Científica pela CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), realizando projetos na área de Ciências do Solo e Floricultura sob orientação das professoras Dra. Elaine Reis Pinheiro Lourente, Dra. Paula Pinheiro Padovese Peixoto e Dra. Yara Brito Chaim Jardim Rosa. Realizou graduação sanduíche na Universidad Austral de Chile (UACH), Câmpus de Isla Teja – Valdivia, pelo Programa MARCA-Mercosul como bolsista CAPES. Mestre em Agronomia (Produção Vegetal) em 26 de julho de 2016, pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (UNESP), Campus de Jaboticabal-SP, sob orientação da Profa. Dra. Kathia Fernandes Lopes Pivetta. Ingressou no Doutorado pelo Programa de Pós-graduação em Agronomia (Produção Vegetal) – em 03 de agosto de 2016, pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (UNESP), Campus de Jaboticabal-SP, sendo bolsista da CAPES, tendo como orientadora a Profa. Dra. Kathia Fernandes Lopes Pivetta e coorientadores os Professores PhD. Wagner A. Vendrame e Dr. José Carlos Sorgato. Realizou Doutorado Sanduíche na University of Florida (UF/IFAS) no Tropical and Education Center (TREC) sob supervisão do Professor PhD. Wagner Aparecido Vendrame.

À Deus, por ser meu refúgio e minha fortaleza.  
Aos meus pais Eva Rosalia Targanski e Erval Sajovic Pereira pela dedicação, amor incondicional e sacrifícios durante minha vida, as minhas avós Zélia Sajovic Pereira e Maria Targanski pelos ensinamentos e carinho, aos meus irmãos Evandro, Gabriela e Herval por todo carinho e incentivo oferecidos, e aos meus amados sobrinhos Arthur, Heitor, Davi, Guilherme e Henrique por serem esperança e alegria.  
Ao Fernando pelo cuidado, amor e carinho.

**Dedico**

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Estadual Paulista – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal – FCAV/UNESP, pelos ensinamentos oferecidos.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão de bolsa de estudos de doutorado e de bolsa Sanduíche.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

À Professora Dra. Kathia Fernandes Lopes Pivetta, pela orientação, pela oportunidade de aprender, crescer e trabalhar com o que gosto, por apresentar de forma fascinante o universo da floricultura e paisagismo, pela amizade, pelos ensinamentos acadêmicos e de vida, e pela paciência dispensada ao longo dessa jornada, fundamentais para meu crescimento como profissional, pesquisadora, docente e principalmente como ser humano.

Aos meus pais Eva Rosalia Targanski e Erval Sajovic Pereira pelo carinho, paciência, apoio à minhas decisões, exemplo de vida, conversas, ensinamentos e infinito amor.

Ao Professor Dr. Wagner Aparecido Vendrame, pela oportunidade e receptividade em seu laboratório, pela coorientação, e por estar sempre disposto a esclarecer minhas dúvidas.

Ao Professor Dr. José Carlos Sorgato, pela coorientação, por me permitir voltar à UFGD, pelo aprendizado e ensinamentos.

Aos docentes do curso de Pós-Graduação em Produção Vegetal da FCAV/Unesp pela importante contribuição acadêmica.

Ao Prof. Dr. Ricardo Tadeu Faria da Universidade Estadual de Londrina-UEL e aos seus orientados Douglas Bertoncelli, Gianne Stulzer e Jean Baudraz pelo aprendizado e receptividade.

Ao Prof. Dr. Sérgio Valiengo Valeri docente da FCAV/Unesp pelos ensinamentos, oportunidade de fazer estágio docência e colega nas aulas de Yoga.

Aos membros da Comissão do Exame Geral de Qualificação Dr. Marcos Vieira Ferraz e Profa. Dra. Renata Aparecida de Andrade, e aos membros da Banca Examinadora Prof. Dr. Paulo Hercílio Viegas Rodrigues, Prof. Dr. Ricardo Tadeu Faria, Profa. Dra. Renata Aparecida de Andrade e Dr. Gilberto Rostirolla

Batista de Souza, pelas valiosas contribuições para a melhoria do artigo científico e da Tese.

Aos técnicos de laboratório Jackeline Schultz Soares (UFGD) e David Beleski (UF/IFAS, TREC), pela ajuda, por tirar dúvidas, pelas risadas e amizade. Aos membros da Comissão do Exame Geral de Qualificação o Dr. Marcos Vieira Ferraz a Profa. Dra. Renata Aparecida de Andrade.

Aos funcionários do Departamento de Produção Vegetal e do Viveiro Experimental de Plantas Ornamentais e florestais da Unesp de Jaboticabal: Rosane Betioli, Wagner Tarina, Adevair Pugliano e Roberto Carlos Costa pelo apoio, ensinamentos e amizade.

Aos colegas do Grupo de Estudos e Pesquisa em Paisagismo e Floricultura -GEPFlor, Gilberto Rostirolla, Renata Gimenes, Carla Costa, Marina Nogueira, Amanda Bezerra, Lívia Praseres, Cibele Mantovani, Ana Carolina Muniz, Águila Santos, Guilherme Vieira, Giovanna Meira, Milena Souza e Larissa Trinque pela troca de ensinamentos, parceria tanto em laboratório quanto em visitas técnicas e principalmente pelo convívio, pois esse me tornou alguém melhor.

Aos amigos Tatiane Jeromini, Jordana Florês e Ricardo Fachinelli por todo apoio, pelo amparo nos momentos difíceis, pelos momentos de alegria, e principalmente pela amizade, serei eternamente grata.

À Maria do Carmo Carvalho (Nina) pelo convívio, cuidado e amizade ao longo de todo o período de pós-graduação.

À Marli da Guia Pelizaro Valeri, minha instrutora de Yoga por ter me acolhido, ajudado a aprender a respirar, acalmar, refletir e pelas conversas.

Ao Fernando Rodrigues e sua família pelo carinho e acolhimento.

Por fim, a todos aqueles que fizeram parte na minha trajetória acadêmica e depositaram uma enorme confiança em mim e que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

## SUMÁRIO

|                                                                                                                                                                                          | Página |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| RESUMO.....                                                                                                                                                                              | iii    |
| ABSTRACT.....                                                                                                                                                                            | iv     |
| CAPÍTULO 1 - Considerações gerais.....                                                                                                                                                   | 1      |
| 1.1 Introdução.....                                                                                                                                                                      | 1      |
| 1.2 Revisão De Literatura.....                                                                                                                                                           | 2      |
| 1.2.1 A família Orchidaceae.....                                                                                                                                                         | 2      |
| 1.2.2 Os gêneros de orquídeas: <i>Brassavola</i> , <i>Encyclia</i> e <i>Epidendrum</i> .....                                                                                             | 3      |
| 1.2.3 Características das sementes de orquídeas e o desenvolvimento dos protocormos.....                                                                                                 | 5      |
| 1.2.4 Fontes de luz na semeadura e no desenvolvimento <i>in vitro</i> .....                                                                                                              | 6      |
| 1.2.5 Formulações de meio de cultivo.....                                                                                                                                                | 8      |
| 1.2.6 Criopreservação de sementes de orquídeas.....                                                                                                                                      | 9      |
| 1.3 Referências.....                                                                                                                                                                     | 11     |
| CAPÍTULO 2 - Lâmpada fluorescente ou LEDs, e qual formulações de meio de cultivo utilizar na germinação e no desenvolvimento inicial <i>in vitro</i> de <i>Brassavola perrini</i> ?..... | 18     |
| Resumo.....                                                                                                                                                                              | 18     |
| 2.1 Introdução.....                                                                                                                                                                      | 18     |
| 2.2 Material E Métodos .....                                                                                                                                                             | 20     |
| 2.3 Resultados .....                                                                                                                                                                     | 22     |
| 2.4 Discussão .....                                                                                                                                                                      | 25     |
| 2.5 Conclusões .....                                                                                                                                                                     | 28     |
| 2.6 Referências .....                                                                                                                                                                    | 29     |
| CAPÍTULO 3 - Eficiência de crioprotetores na criopreservação de duas espécies de orquídeas das Américas.....                                                                             | 32     |
| Resumo.....                                                                                                                                                                              | 33     |
| 3.1 Introdução.....                                                                                                                                                                      | 33     |
| 3.2 Material E Métodos.....                                                                                                                                                              | 35     |
| 3.3 Resultados.....                                                                                                                                                                      | 38     |
| 3.4 Discussão .....                                                                                                                                                                      | 41     |

|                              |           |
|------------------------------|-----------|
| <b>3.5 Conclusões .....</b>  | <b>45</b> |
| <b>3.6 Referências .....</b> | <b>45</b> |

## GERMINAÇÃO DE SEMENTES E CONSERVAÇÃO DE ORQUÍDEAS NATIVAS DAS AMÉRICAS

**RESUMO** – A propagação *in vitro* e conservação *ex situ*, são técnicas, que podem ser aprimoradas através da escolha adequada da fonte luminosa, das formulações do meio de cultivo e de crioprotetores. O presente estudo teve por objetivos: (i) estudar fontes de luz a partir de lâmpadas fluorescentes e diodos emissores de luz (LEDs) e formulações de meio de cultivo na germinação e no desenvolvimento inicial da espécie de orquídea *Brassavola perrinii* e (ii) avaliar a eficiência da solução vitrificante (PVS2) combinada ao floriglucinol 1% em nitrogênio líquido para a criopreservação de sementes maduras das espécies *Encyclia cordigera* e *Epidendrum ciliare*. Os experimentos foram instalados em delineamento inteiramente casualizado e ambos foram duplicados. No primeiro os tratamentos foram arranjos em esquema fatorial 5x4 com cinco condições de luz: LF - lâmpada fluorescente; LB - LED branco; LA - LED azul; LV- LED vermelho e LAV – LED azul (50%) e vermelho (50%) e quatro formulações de meio de cultivo (MS, ½MS, VW e K), com quatro repetições e média de 125 sementes por parcela. Aos 90 dias após a semeadura foram avaliadas a porcentagem de germinação, de protocormos clorofilados e o desenvolvimento dos protocormos através das classes: P1, P2, P3 e P4 para cálculo do índice de desenvolvimento protocormos. No segundo experimento foram oito tratamentos: 1) germinação *in vitro* direta; 2) imersão direta em nitrogênio líquido, sem crioprotetores; 3) PVS2 por 60 min; 4) PVS2 por 120 min; 5) PVS2 por 180 min; 6) PVS2 + floriglucinol1% por 60 min; 7) PVS2 + floriglucinol1% por 120 min; 8) PVS2 + floriglucinol1% por 180 min, com cinco repetições e média de 120 sementes por parcela. Imersão em nitrogênio líquido, à temperatura de -196 °C por 72 horas. Foram avaliadas a viabilidade e a porcentagem de germinação das sementes, antes e após a aplicação dos tratamentos. Aos 45 dias após a recuperação da criopreservação foi avaliado o desenvolvimento dos protocormos através das classes morfológicas P1, P2 e P3. Os dados foram submetidos à análise de variância e aqueles com valor percentual foram previamente transformados em arco-seno  $(x/100)^{1/2}$ . As médias foram comparadas pelo teste de Tukey  $p < 0,05$ . Para *B. perrinii*, concluiu-se que o percentual de germinação não foi influenciado pelos espectros de luz, mas foi maior nas formulações ½ MS e VW. O maior índice de desenvolvimento dos protocormos de *B. perrinii* foi observado quando submetidos ao espectro de luz da fonte de iluminação com lâmpadas fluorescentes em meio de cultivo Vacin e Went. A utilização da solução vitrificante (PVS2) combinado ao floriglucinol 1% foi eficiente na recuperação de sementes criopreservadas em nitrogênio líquido, elevou a porcentagem de germinação e desenvolvimento dos protocormos para as duas espécies em estudo. Os resultados observados indicam o uso de PVS2 combinado com floriglucinol 1% por 60 min para a criopreservação de sementes de *E. cordigera*, e PVS2 com floriglucinol 1% por 180 min para sementes de *E. ciliare*. O presente estudo também indica que a resposta à criopreservação após o armazenamento à frio é específica da espécie e requer ajustes no tempo de exposição ao PVS2 a 0 °C antes da imersão em nitrogênio líquido.

**Palavras-chave:** criopreservação, fontes de luz, meio de cultivo, protocormo, semeio *in vitro*, solução pré-vitrificante

## SEED GERMINATION AND CONSERVATION OF NATIVE ORCHIDS FROM AMERICAS

**ABSTRACT** – *In vitro* propagation and *ex situ* conservation, are techniques that can be improved through the appropriate choice of light source, formulations of the culture medium and cryoprotectants. The aims this work was: (i) study the effect of light sources from fluorescent lamps and light-emitting diodes (LEDs) and cultivation medium formulations on the germination and initial development of *Brassavola perrinii* orchid and (ii) evaluate the efficiency of the vitrify solution (PVS2) combined with phloroglucinol 1% in liquid nitrogen for the cryopreservation of mature seeds of the species *Encyclia cordigera* and *Epidendrum ciliare*. The experiments were installed in a completely randomized design and both were duplicated. In the first, the treatments were arranged in a 5x4 factorial scheme with five light conditions: LF - fluorescent lamp; LB - white LED; LA - blue LED; LV- Red LED and LAV - Blue LED (50%) and red (50%), and four cultivation medium formulations (MS, ½MS, VW and K), with four replications and an average of 125 seeds per plot. At 90 days after sowing, the percentage of germination, of chlorophyll protocorms and the development of protocorms through the classes: P1, P2, P3 and P4 to calculate the protocorms development index. In the second experiment, there were eight treatments: 1) direct *in vitro* germination; 2) direct immersion in liquid nitrogen, without cryoprotectants; 3) PVS2 for 60 min; 4) PVS2 for 120 min; 5) PVS2 for 180 min; 6) PVS2 + floroglucinol1% for 60 min; 7) PVS2 + floroglucinol1% for 120 min; 8) PVS2 + floroglucinol1% for 180 min, respectively), with five repetitions and an average of 120 seeds per plot. Immersion in liquid nitrogen, at a temperature of -196 °C for 72 hours. Viability was evaluated using the tetrazolium test, and the germination percentage of the seeds, before and after the application of the treatments. 45 days after the recovery of cryopreservation, the development of the protocorms was evaluated through the morphological classes P1, P2 and P3. The data were submitted to analysis of variance and those with percentage values were previously transformed into arc sine  $(x/100)^{1/2}$ . The means were compared using the Tukey test  $p < 0,05$ . For *B. perrinii*, he concluded that the germination percentage was not influenced by the light spectra but was higher in the ½ MS and VW formulations. The highest rate of development of *B. perrinii* protocorms was observed when using the light spectrum of the light source with fluorescent lamps in the Vacin and Went culture medium. The use of the vitrify solution (PVS2) combined with phloroglucinol 1% was efficient in the recovery of cryopreserved seeds in liquid nitrogen, increasing the percentage of germination and development of protocorms for the two species under study. The observed results indicate the use of PVS2 combined with 1% floroglucinol for 60 min for the cryopreservation of *E. cordigera* seeds, and PVS2 with 1% phloroglucinol for 180 min for *E. ciliare* seeds. The present study also indicates that the response to cryopreservation after cold storage is species-specific and requires adjustments in the time of exposure to PVS2 at 0 ° C before immersion in liquid nitrogen.

**Keywords:** cryopreservation, light sources, culture medium, protocorm, *in vitro* sowing, pre-vitrification solution

## CAPÍTULO 1 - Considerações gerais

### 1.1 Introdução

A família Orchidaceae é a segunda maior família de plantas com flores (Chase et al., 2015). No entanto, em decorrência da frequente destruição de seus habitats naturais, somado ao comércio e exploração ilegal, e devido às suas características ornamentais, muitas espécies de orquídeas estão desaparecendo da natureza em níveis preocupantes, levando inúmeras espécies à extinção (Galdiano Júnior et al., 2012; Hosomi et al., 2012).

As sementes de orquídeas contêm embrião rudimentar com poucas reservas (Arditti, 1992), são desprovidas de cotilédones e apresentam endosperma extremamente reduzido, essas características comprometem a nutrição do embrião durante o processo germinativo (Ferreira et al., 2010). Na natureza essas sementes dependem exclusivamente de associação com fungos micorrízicos específicos para completar seu desenvolvimento (Agustini et al., 2009).

Para contornar essa problemática pode ser realizada a semeadura assimbiótica *in vitro*, que de acordo com Martini et al. (2001), é uma técnica relevante do ponto de vista comercial e ecológico. As plantas produzidas dessa forma podem ser utilizadas em programas de reintrodução de espécies nativas em áreas de preservação ambiental devido à variabilidade genética gerada (Schneiders et al., 2012). Portanto, a criação de protocolos de propagação específicos para cada espécie é importante para suprir a demanda pelo consumo crescente, evitando assim a coleta ilegal.

Fatores exógenos e endógenos influenciam no processo germinativo de sementes de orquídeas. Os que podem ser controlados, ou seja, os exógenos, englobam a composição do meio nutritivo, luz e temperatura (Yeung et al., 2018). O sucesso na tecnologia e aplicação dos métodos de multiplicação *in vitro* deve-se à melhor compreensão dos requerimentos nutricionais das células e dos tecidos em cultura (Schneiders et al., 2012).

Segundo Kauth et al. (2008), para a germinação das sementes de orquídeas epífitas é necessário a presença de luz, enquanto as espécies terrícolas de escuro, embora essas respostas sejam muitas vezes determinadas pela espécie,

independentemente do seu hábito de crescimento. Contudo, são poucos os estudos relacionados aos efeitos que os diferentes espectros de luz têm sobre a germinação de sementes e o desenvolvimento dos protocormos de orquídeas epífitas.

É crescente a necessidade mundial por variabilidade genética para os programas contínuos de melhoramento, assim como, há riscos de erosão genética causada pelo próprio melhoramento, tornando imperativa a conservação de espécies e manutenção de bancos de germoplasma (Carneiro, 2014).

A criopreservação representa um dos pilares da conservação *ex situ* da biodiversidade, assim, com a utilização dessa técnica podem ser criados bancos de sementes (Seaton et al., 2010; Merritt et al., 2014; Popova et al., 2016). O método consiste na conservação de material vegetal por longos períodos em temperaturas ultrabaixas (Vendrame et al., 2014). A utilização dessa técnica para a conservação de sementes de orquídeas é uma das ferramentas que pode ser utilizada na criação desses bancos de germoplasma, tornando disponível o material para o melhoramento genético de orquídeas, que é baseado principalmente no desenvolvimento de híbridos (Arditti, 1984; Carneiro, 2014).

A elucidação dos protocolos adequados para obtenção do meio de cultivo ideal, estudo da luz e conservação das diferentes espécies de orquídeas é relevante, pois, técnicas direcionadas auxiliam na otimização dos sistemas de propagação *in vitro* e de conservação *ex situ*, favorecendo os meios acadêmico, comercial e ecológico.

Assim, o presente estudo teve como principais objetivos estudar fontes de luz a partir de lâmpadas fluorescentes e diodos emissores de luz (LEDs) e formulações de meio de cultivo na germinação e no desenvolvimento inicial da espécie de orquídea *Brassavola perrinii* e avaliar a eficiência da solução vitrificante (PVS2) combinada ao floroglucinol 1% em nitrogênio líquido para a criopreservação de sementes maduras das espécies *Encyclia cordigerae* e *Epidendrum ciliare*.

## **1.2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **1.2.1 A família Orchidaceae**

Orchidaceae é a segunda maior família de plantas com flores (Chase et al., 2015). Estima-se que o número de gêneros esteja entre 559 a 880 e de espécies entre 18.814 a 30.000 (Givnish et al., 2015; Hsiao et al., 2011; Zotz, 2013). O grande número de espécies dessa família permite dividi-lo em cinco subfamílias: Apostasioideae, Vanilloideae, Cyripedioideae, Orchidoideae e Epedendroideae (Tsai et al., 2017). Conhecidas por sua grande diversidade de flores e distribuição global (Merritt et al., 2014), atualmente, novas espécies de orquídeas ainda são registradas em todo o mundo (Tsai et al., 2017).

Não existe um número exato de espécies relatado para a América do Sul e América central, de acordo com o levantamento de Gaskett e Gallagher (2018) o México conta com 1.560 e a América do Norte com 394 espécies. O Brasil conta com 217 gêneros, 10 subespécies e 2.443 espécies de orquídeas (Jardim Botânico do Rio, 2019).

Esse grupo de plantas apresenta características únicas, que incluem a interação obrigatória entre orquídeas e fungos micorrízicos (Agustini et al., 2009), fotossíntese C3 (Hew e Yong, 2004) ou metabolismo ácido das crassuláceas (Motomura et al., 2008) e o crescimento epifítico representado por 70% das espécies de orquídeas (Hsiao et al., 2011).

As orquídeas são plantas de características ornamentais, pela beleza e diversidade de formas e cores de suas flores, sendo conhecidas, apreciadas, utilizadas e comercializadas em diferentes partes do mundo (Popova et al., 2016).

As principais espécies com valor ornamental pertencem a diversos gêneros, como por exemplo: *Cymbidium*, *Dendrobium*, *Phalaenopsis*, *Cattleya* e *Oncidium* (Yeung et al., 2018). Devido a sua beleza, essas plantas são retiradas excessivamente da natureza, levando inúmeras espécies ao risco de extinção (Faria et al., 2006; Ferreira e Suzuki, 2008). Além das orquídeas terem grande valor ornamental e comercial, são apreciadas na medicina tradicional sendo realizados diversos estudos farmacológicos que validaram a sua utilização etnobotânica (Barreto e Parente, 2006).

### **1.2.2 Os gêneros de orquídeas: *Brassavola*, *Encyclia* e *Epidendrum***

O gênero *Brassavola* abrange 15 espécies epífitas, sendo uma de suas principais características morfológicas apresentar pseudobulbo delgado e geralmente curto, com uma única folha alongada. *Brassavola* se destaca entre os principais gêneros encontrados no Brasil (Faria et al., 2012) e apresenta interesse econômico, pois se intercruciza com *Cattleya*, *Laelia*, *Sophranitis* e *Epidendrum* (Soares et al., 2012) originando híbridos com características morfológicas de maior interesse do que as dos progenitores (Vidoz et al., 1999).

A espécie *Brassavola perrinii* Lindl. possui hábito epifítico ou litrófico e pode ser encontrada nos seguintes países: Bolívia, Brasil, Paraguai e na Argentina. Essa espécie é comumente confundida com a *B. tuberculata*, embora ambas sejam muito parecidas, *B. perrinii* não apresenta pontos pretos vermelho-arroxeados em suas sépalas e o porte da planta é menor, com folhas menores e maior número de flores comparada a *B. tuberculata* (Lavarack, 2002). Lavarack et al. (2002) e Schinini (2010) reconhecem *B. perrinii* como uma espécie distinta de *B. tuberculata*, diferentemente de Jardim Botânico do Rio (2019) e Govaerts (2003) que reconhece *B. perrinii* como sinônimo heterotípico de *B. tuberculata*.

Estima-se que, o gênero *Encyclia* Hooker seja constituído por 180 espécies neotropicais (Carnevali et al., 2018), que ocorrem do sul da América do Norte (Flórida-EUA e México) até o sul da América do Sul (Brasil e nordeste da Argentina) (van den Berg e Carnevali, 2005), distribuídas entre habitats epifíticos e litróficos (Lavarack et al., 2002). Essas espécies geralmente exibem pseudobulbos completamente ovóides podendo ser levemente achatado, duas ou três folhas, uma única inflorescência terminal e flores com um labelo trilobado, não adnado à coluna (Bastos et al., 2018).

*Encyclia cordigera* Dresser é uma das espécies mais apreciadas dentro do gênero devido à beleza de seus labelos rosados e fragrância de suas flores, que se assemelha ao cheiro das rosas (Lavarack et al., 2002), ocorre da América Central ao norte da América do Sul (Bastos et al., 2018).

O gênero *Epidendrum* L. aparece entre os mais diversificados da família Orchidaceae com aproximadamente 1.800 espécies, é neotropical e suas espécies são distribuídas do sudeste dos Estados Unidos ao norte da Argentina, mas com maior diversidade em florestas úmidas andinas e subandinas da América do Sul e da América Central. Apresenta ampla variação morfológica, especialmente em relação

ao hábito (epífito, rupícola ou terrícola), tamanho, morfologia e cor das flores (amarelas, esverdeadas, brancas, vermelhas, rosadas e púrpuras) (Hágsater e Soto-Arenas, 2005).

A espécie *Epidendrum ciliare* L. pode ser encontrado desde o sul do México até a parte norte da América do Sul. Cresce nas árvores ou nas rochas, geralmente em pleno sol (Lavarack et al., 2002). As espécies *Encyclia cordigera* e *Epidendrum ciliare* L. vêm sendo utilizadas na criação de híbridos intergenéricos, devido a beleza de suas flores e para a geração de novidade para o mercado de plantas ornamentais (Lavarack et al., 2002).

### **1.2.3 Características das sementes de orquídeas e o desenvolvimento dos protocormos**

Em orquídeas, após a polinização e fertilização, há o desenvolvimento de muitas (Yeung et al., 2018), podendo chegar a 4 milhões em uma única cápsula. As sementes são muito pequenas e leves, o comprimento médio dentro das espécies conhecidas varia de 0,05 a 6,00 mm e a massa de 0,31 a 24,00 µg; a produção de grande quantidade de sementes é relatada como uma característica comum de plantas que têm requerimentos específicos de germinação (Arditti e Ghani, 2000).

A germinação de sementes de orquídeas *in vitro* vem sendo realizada desde o início do século passado, quando Knudson em 1922, descreveu a germinação em meio de cultura asséptico (Knudson, 1922). A semeadura assimbiótica de orquídeas constitui em uma técnica bastante relevante do ponto de vista comercial e ecológico (Martini et al., 2001). As plantas produzidas dessa forma podem ser utilizadas em programas de reintrodução de espécies nativas em áreas de preservação ambiental devido à variabilidade genética gerada pelo explante (Schneiders et al., 2012).

As sementes de orquídeas contêm embrião rudimentar com poucas reservas, constituído principalmente por lipídeos e proteínas (Arditti, 1992). Pouco se sabe sobre os requerimentos específicos do processo germinativo *in situ*, especialmente o papel e a especificidade do hospedeiro de fungos micorrízicos durante a germinação e através do desenvolvimento subsequente dos protocormos (Stewart e Kane, 2006; Rasmussen et al., 2015).

Fatores endógenos e exógenos influenciam no processo germinativo de sementes de orquídeas e no subsequente desenvolvimento de plântulas. Os fatores endógenos podem ser: hormônios vegetais e a composição da testa, já os fatores exógenos são: composição do meio nutritivo, luz e temperatura (Yeung et al., 2018).

Segundo os mesmos autores, as orquídeas epífitas, maior parte dos gêneros encontrados no comércio, como por exemplo, orquídeas dos gêneros *Cattleya*, *Dendrobium*, *Oncidium* e *Phalaenopsis*, possuem requerimentos para o processo germinativo menos exigente do que as orquídeas terrícola e de clima temperado. As sementes de orquídeas epífitas geralmente não apresentam dormência, a maior taxa de germinação é obtida com sementes que estão atingindo a maturidade fisiológica e a testa das espécies epifíticas não apresenta lignificação. Por essas razões, sementes maduras de orquídeas epífitas podem ser utilizadas em semeadura assimbiótica.

Yeung et al. (2018) comentam ainda que, uma vez estabelecidas as condições ideais para a germinação, o embrião envolto pela testa irá entumecer e, começará o desenvolvimento do protocormo e a retomada da atividade mitótica. Os protocormos podem começar a ficar com coloração verde, formando o meristema apical, seguido da emissão da parte aérea e radicular dando origem a plântula.

A formação dos protocormos é uma característica da germinação de sementes de orquídeas. Essa estrutura pode ser considerada equivalente ao hipocótilo de plântulas de outras espécies vegetais (Batygina et al., 2003). A quantificação do estágio de desenvolvimento dos protocormos em muitas espécies de orquídeas tornou-se possível de se avaliar com precisão, através dos métodos de germinação *in vitro* (Suzuki et al., 2009; Silva et al., 2015).

#### **1.2.4 Fontes de luz na semeadura e no desenvolvimento *in vitro***

A luz é um fator importante na regulação do crescimento e desenvolvimento de plantas, seu espectro deve atender as exigências da planta para a fotossíntese e o desenvolvimento fotomorfogênico (Silva et al., 2014).

Segundo Kauth et al. (2008) orquídeas epífitas necessitariam de luz e as espécies terrícolas do escuro para a germinação, embora essas respostas sejam

muitas vezes determinadas pela espécie, independentemente do seu hábito de crescimento.

Entre as fontes de radiação comumente utilizadas em ambientes controlados de crescimento de plantas, está a lâmpada fluorescente. Esse tipo de lâmpada comercial foi desenvolvido para aplicações em iluminação de ambientes humanos. Uma vez que os fotorreceptores de plantas diferem dos seres humanos, as fontes de luz utilizadas atualmente nas instalações de cultivo de plantas apresentam várias limitações e, conseqüentemente, não são uma fonte de radiação ideal (Bula et al., 1991; Lazzarini et al., 2017).

No entanto, lâmpadas fluorescentes emitem um amplo espectro luminoso, que varia de 350 a 750 nm (Ramírez-Mosqueda et al., 2017). O balanço espectral da fonte, não só afeta a eficiência fotossintética como também tem um impacto significativo na manutenção do balanço térmico na câmara de crescimento e sobre as plantas (Bula et al., 1991).

Os diodos emissores de luz (LEDs), tiveram sua utilização relatado no sistema de crescimento de plantas pela primeira vez por Bula et al. (1991). A iluminação com LEDs apresenta uma série de vantagens em comparação aos sistemas de iluminação tradicional, como longa durabilidade, redução do consumo de energia elétrica, circuitos eletrônicos mais simples e mais confiáveis, geração de pouco calor (Massa et al., 2008), tamanho reduzido, comprimento de onda específico, intensidade e qualidade de luz ajustáveis, bem como alta eficiência de conservação fotoelétrica, assim, os LEDs tornaram-se ideais para suportar o crescimento de plantas em ambientes controlados (Yeh e Chung, 2009).

Os LEDs são um tipo de diodo semicondutor, e podem ter um pico de emissão de luz variando de 220 a 1000 nm, com capacidade de controle espectral que permite que os comprimentos de onda sejam ajustados aos fotorreceptores das plantas, influenciando de maneira satisfatória sua morfologia e composição vegetal (Olle e Virsilè, 2013).

Desde o início dos estudos sobre o efeito das lâmpadas do tipo LEDs sobre germinação e desenvolvimento de plantas, as cores que mais vem sendo estudadas são a azul, vermelha e branca, de forma isolada ou com diferentes combinações entres elas.

O LED azul, têm comprimento de onda que varia de 400 – 500 nm e o LED vermelho emite um espectro luminoso estreito de 660 nm (Lazzarini et al., 2017). O LED branco, possui comprimento de onda no intervalo de 460 – 560 nm e apresenta uma maior proporção de luz azul e verde, e uma menor proporção de ultravioleta no espectro em relação a lâmpada fluorescente. Já o espectro no vermelho emite menos proporção vermelho distante em comparação às lâmpadas fluorescentes (Fraszczak et al., 2014).

Os efeitos fisiológicos e morfológicos de plantas cultivados sob LED têm sido relatados para diferentes orquídeas, incluindo *Cymbidium* (Tanaka et al., 1998; Nhut et al., 2018), *Bletilla ochracea* (Godo et al., 2011), *Oreorchis patens* (Bae et al., 2014), *Calanthe discolor* (Bae et al., 2015), *Paphiopedium elongato* (Luan et al., 2015), *Microlaelia lundii* (Favetta et al., 2017) e *Phalaenopsis* (Nhut et al., 2018).

### 1.2.5 Formulações de meio de cultivo

Um dos principais fatores para o sucesso do cultivo assimbiótico *in vitro* é a escolha adequada da formulação do meio de cultivo, pois, esse fornece todas as substâncias essenciais para a germinação (Soares et al., 2012). A necessidade nutricional específica também varia para cada fase de desenvolvimento dos protocormos e para diferentes espécies de orquídeas em estudo (Jorge et al., 2014).

Em meios de cultivo, além dos nutrientes minerais, a incorporação de açúcares também é imprescindível, pois, no cultivo *in vitro* as plântulas não são suficientemente autotróficas, sendo necessária a adição de uma fonte de carbono, como a sacarose. Outros componentes acrescentados ao meio de cultura são as vitaminas, que funcionam como cofatores enzimáticos, que em condições naturais as plantas sintetizam essas substâncias para utilizá-las em seu crescimento e desenvolvimento (Faria et al., 2012).

As formulações dos meios de cultivo utilizadas na germinação de sementes e desenvolvimento de orquídeas são compostas por macro e micronutrientes, vitaminas e sais minerais (Murashige e Skoog, 1962). As mais utilizadas para a semeadura e cultivo *in vitro* de orquídeas são o meio MS (Murashige e Skoog, 1962), VW (Vacin e Went, 1949) e K (Knudson, 1946).

Diferentes respostas dos meios à germinação e desenvolvimento dos protocormos são relatadas na literatura, para as espécies *Calopogon tuberosus* var. *tuberosus* (Kauth et al., 2008); *Hadrolaelia tenebrosa* (Suzuki et al., 2009); *Cattleya bicolor* (Suzuki et al., 2010); *Cattleya warneri* (Jorge et al., 2014); *Cattleya labiata* (Melo et al., 2015); *Brassavola martiana* (Alves, 2018) e *Catasetum macrocarpum* (Ferreira et al., 2018), sugerindo assim a necessidade de buscar meios específicos para cada espécie.

### 1.2.6 Criopreservação de sementes de orquídeas

Os mecanismos para conservar as inúmeras espécies de orquídeas, requerem uma integração complexa de preservar habitats naturais (conservação *in situ*) e o desenvolvimento e aplicação de metodologias de conservação *ex situ* (Popova et al., 2016).

A biotecnologia oferece duas técnicas para a conservação de espécies vegetais, sendo estas a conservação *in vitro* e a criopreservação (Vendrame e Khoddamzadeh, 2017). A criopreservação representa um dos pilares da conservação *ex situ* da biodiversidade, assim, com a utilização dessa técnica podem ser mantidos os bancos de sementes, sendo ainda uma alternativa promissora para outras abordagens de conservação, como a vitrificação e encapsulamento-desidratação (Seaton et al., 2010; Merritt et al., 2014; Popova et al., 2016).

A utilização de temperaturas criogênicas para o armazenamento de sementes a longo prazo em um banco de sementes, consiste no armazenamento de material vegetal em nitrogênio na fase líquida a uma temperatura de -196 °C, ou na fase de vapor à cerca de -150 °C por longos períodos e com baixo risco de variação genética ou fisiológica (Reed, 2008; Vendrame e Khoddamzadeh, 2017). Sob temperaturas criogênicas, toda a atividade metabólica em células vivas é interrompida e o material genético pode ser mantido sem contaminação e variações somaclonais por um período teoricamente ilimitado de tempo (Wang et al., 2014).

Para a criopreservação de orquídeas, diferentes órgãos vegetais podem ser utilizados, tais como: pólen (Vendrame et al., 2008), protocormos (Merritt et al., 2014; Vendrame e Faria, 2011) e sementes (Galdiano Júnior et al., 2012; Hughes e Kane,

2018; Suzuki et al., 2018). Para orquídeas, os bancos de germoplasma são fundamentais devido à pouca durabilidade das sementes, principalmente com relação as espécies de orquídeas de regiões tropicais (Machado Neto e Custódio, 2005). Além disso, o tamanho diminuto das sementes, torna-se uma vantagem na criopreservação, pois possibilita o armazenamento de quantidades ainda maiores de material vegetal quando comparado a outras culturas (Carneiro, 2014).

Técnicas como a vitrificação e o encapsulamento-desidratação, com base em congelamento ultrarrápido de materiais, tem por finalidade minimizar os danos da dessecação e do congelamento (Santos, 2000). De acordo com Kaviani (2011), a vitrificação envolve a remoção total ou parcial da água passível de congelamento, por meio da desidratação física ou osmótica do material vegetal, seguido do congelamento ultrarrápido em nitrogênio líquido.

A solução vitrificante (PVS2) têm sido uma das soluções crioprotetoras mais utilizadas atualmente (Sakai et al., 1990). No entanto, a eficiência e a recuperação do material vegetal após a criopreservação podem ser baixas devido ao estresse oxidativo e à toxicidade de certos componentes em solução vitrificante. Para contornar essa situação, o uso do floroglucinol (PG) tem sido bem-sucedido na criopreservação de alguns híbridos e espécies de orquídeas (Galdiano Júnior et al., 2012; 2013; Vendrame e Faria, 2011).

O floroglucinol é um 1,3,5-trihidroxibenzeno (derivado do trinitrobenzeno) que ocorre naturalmente em compostos fenólicos de plantas. Os compostos bioativos de ocorrência natural podem ser isolados de fontes como plantas, algas (família Phaeophyceae e Fungaceae) e microrganismos (Silva et al., 2013). O floroglucinol é conhecido por proteger as células contra o estresse oxidativo, inflamação e danos causados pelos radicais livres (Kang et al., 2006; Kim e Kim, 2010).

O sucesso dos processos de criopreservação envolve o controle rigoroso no processo de desidratação, permeabilidade da solução crioprotetora e prevenção de lesões causadas por estresse osmótico e toxicidade dos componentes químicos das soluções durante a desidratação (Vendrame et al., 2014; 2018). Sabe-se que, a vitrificação fornece uma transição adequada da água intracelular para um estado de vidro amorfo que impede a cristalização do gelo e consequentemente danos às células (Kulus e Zalewska, 2014).

O estudo de distintos métodos de criopreservação encontra-se em desenvolvimento, e ainda requer pesquisa com relação aos tipos de tratamento a serem utilizados para criopreservar e a melhor metodologia a ser aplicada as diferentes espécies. Sendo assim, todavia há necessidade do desenvolvimento de protocolos específicos, já que existem diferentes métodos para criopreservação e variações nas respostas das orquídeas a esses métodos (Vendrame et al., 2014).

### 1.3 REFERÊNCIAS

- Agustini V, Sufaati S, Suharno S (2009) Mycorrhizal Association of Terrestrial Orchids of Cycloops Nature Reserve, Jayapura. **Biodiversitas Journal of Biological Diversity** 10:175-180.
- Alves LR (2018) **Análise da propagação e desenvolvimento inicial *in vitro*, e aclimatização de *Brassavola martiana* Lindl (Orchidaceae).** 42 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia) – UFT, Porto Nacional.
- Arditti J (1984) An history of orchid hybridization, seed germination and tissue culture. **Botanical journal of the Linnean Society** 89:359-381.
- Arditti J (1992) **Fundamentals of orchid biology.** New York: John Wiley & Sons, 691p.
- Arditti J, Ghani AKA (2000) Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. **New Phytologist, Lancaster** 145:367-421.
- Bae KH, Oh KH, Kim SY (2014) Sodium hypochlorite treatment and light-emitting diode (LED) irradiation effect on in vitro germination of *Oreorchis patens* (Lindl.) Lindl. **Journal of Plant Biotechnology** 41:44-49.
- Bae KH, Oh KH, Kim SY (2015) In vitro seed germination and seedling growth of *Calanthe discolor* Lindl. **Plant Breeding and Seed Science** 71:109–119.
- Barreto DW, Parente JP (2006) Chemical properties and biological activity of a polysaccharide from *Cyrtopodium cardiochilum*. **Carbohydrate polymers** 64:287-291.
- Bastos CA, Meneguzzo TE, van den Berg C (2018) A taxonomic revision of the Brazilian species of *Encyclia* (Orchidaceae: Epidendroideae: Epidendreae). **Phytotaxa** 342:1-84.
- Batygina TB, Bragina EA, Vasilyeva VE (2003) The reproductive system and germination in orchids. **Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica** 45:21–34.

Bula RJ, Morrow RC, Tibbitts TW, Barta, DJ, Ignatius RW, Martin TS (1991) Light-emitting diodes as a radiation source for plants. **HortScience** 26:203-205.

Carneiro LL (2014) **Pré-melhoramento genético, floração in vitro e criopreservação de orquídeas nativas do cerrado**. 93 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

Carnevali G, Perez-Garcia EA, Leopardi-Verde CL, Tapia-Muñoz JL, Cetzal-Ix WR, Ramírez-Morillo IM, Romero-Gonzalez GA (2018) The *Encyclia ambigua* complex (*Laeliinae*, Orchidaceae), a synopsis and notes on *Encyclia virens* and *Epidendrum alatum*. **Phytotaxa** 372:1-21.

Chase MW, Cameron KM, Freudenstein JV, Pridgeon AM, Salazar G, van den Berg C, Schuiteman A (2015) An updated classification of Orchidaceae. **Botanical journal of the Linnean Society** 177: 151-174.

Faria RT, Assis AM, Unemoto LK, Carvalho JFRP (2012) **Produção de orquídeas em laboratório**. Londrina: Mecenaz, 124p.

Faria RT, Dalio RJD, Unemoto LK, Silva GL (2006) Propagação in vitro de *Oncidium baueri* Lindl. (Orchidaceae) sem uso de ágar. **Acta Scientiarum Agronomy** 28:1-4.

Favetta V, Colombo RC, Mangili Jr. JF, Faria RT (2017) Light sources and cultural media in the *in vitro* growth of the Brazilian orchid *Microlaelia lundii*. **Semina** 38:1775-1784.

Ferreira AWC, Lima MIS, Faria RTD, Ribeiro JPN, Casali CA (2010) Propagation *in vitro* of *Baptistonia pubes* (Lindl.) Chiron & VP Castro (*Oncidium pubes* Lindl. Orchidaceae). **Acta Botanica Brasilica** 24:636-639.

Ferreira AWM, Oliveira SP, Suzuki RM, Silva KLF, Soares Júnior JWP (2018) Germination, growth and morpho-anatomical development of *Catasetum macrocarpum* (Orchidaceae) *in vitro*. **Rodriguésia** 69:2137-2151.

Ferreira WM, Suzuki RM (2008) O cultivo *in vitro* de orquídeas como alternativa para a preservação de espécies nativas ameaçadas de extinção. **Atualidades, desafios e perspectiva da botânica no Brasil** 1:67-68.

Flora do Brasil 2020 em construção. **Orchidaceae**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: < <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/> >. Acesso em: 28 nov. 2019.

Fraszczak B, Golcz A, Zawirska-Wojtasiak R, Janowska B (2014) Growth rate of sweet basil and lemon balm plants grown under fluorescent lamps and LED modules. **Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus** 13:3-13.

Galdiano Júnior RF, Lemos EGM, Faria RT, Vendrame WA (2012) Cryopreservation of *Dendrobium* hybrid seeds and protocorms as affected by phloroglucinol and Supercool X1000. **Scientia Horticulturae** 148:154-160.

Galdiano Júnior RF, Lemos EGM, Vendrame WA (2013) Cryopreservation, early seedling development, and genetic stability of *Oncidium flexuosum* Sims. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 114:139-148.

Gaskett AC, Gallagher RV (2018) Orchid diversity: spatial and climatic patterns from herbarium records. **Ecology and evolution** 8:11235-11245.

Givnish TJ, Spalink D et al. (2015) Orchid phylogenomics and multiple drivers of their extraordinary diversification. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences** 282:20151553.

Godo T, Fujiwara K, Guan K, Miyoshi K (2011) Effects of wavelength of LED-light on in vitro asymbiotic germination and seedling growth of *Bletilla ochracea* Schltr. (Orchidaceae). **Plant Biotechnology** 28:397–400.

Govaerts R, (2003) World Checklist of Monocotyledons Database in ACCESS: 1-71827. **The Board of Trustees of the Royal Botanic Gardens**, Kew. [Cited as *Brassavola tuberculata*.]

Hágsater E, Soto-Arena MA (2005) *Epidendrum* In: Pridgeon AM, Cribb PJ, Chase MW, Rasmussen FN eds. **Genera Orchidacearum**. 251p.

Hew CS, Yong JWH (2004) **The physiology of tropical orchids in relation to the industry**. World Scientific Publishing Company. 369p.

Hosomi ST, Custódio CC, Seaton PT, Marks TR, Machado-Neto NB (2012) Improved assessment of viability and germination of *Cattleya* (Orchidaceae) seeds following storage. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant** 48:127-136.

Hsiao YY, Pan ZJ, Hsu CC, YangYP, Hsu YC, Chuang YC, Shih HH, Chen WH, Tsai WC, Chen HH (2011) Research on orchid biology and biotechnology. **Plant and Cell Physiology** 52:1467-1486.

Hughes BA, Kane, ME (2018) Seed cryopreservation of selected Florida native orchid species. **Seed Science and Technology** 46:431-446.

Jorge J, Abrão MCR, Suzuki RM (2014) Germinação e crescimento inicial *in vitro* de *Cattleya warneri* T. Moore (Orchidaceae). **Revista Brasileira de Biociências** 13:134-141.

Kang KA, Lee KH, Chae S, Zhang R, Jung MS, Ham YM, Baik JS, Lee NH, Hyun, JW (2006) Cytoprotective effect of phloroglucinol on oxidative stress induced cell damage via catalase activation. **Journal of cellular biochemistry** 97:609-620.

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.

Kaviani B (2011) Conservation of plant genetic resources by cryopreservation. **Australian Journal of Crop Science** 5:778.

Kim MM, Kim SK (2010) Effect of phloroglucinol on oxidative stress and inflammation. **Food and Chemical Toxicology** 48:2925-2933.

Knudson L (1922) Nonsymbiotic germination of orchid seeds. **Botanical Gazette** 73:1–25.

Knudson L (1946) A new nutrient solution for the germination of orchid seed. **American Orchid Society Bulletin** 15:214-217.

Kulus D, Zalewska M (2014) Cryopreservation as a tool used in long-term storage of ornamental species—a review. **Scientia Horticulturae** 168:88-107.

Lavarack B, Harris W et al. (2002) **Botanica's Orchid**. San Diego: Laurel Glen Publishing, 568p.

Lazzarini LES, Pacheco FV, Silva ST, Duarte A (2017) Uso de diodos emissores de luz (led) na fisiologia de plantas cultivadas—revisão. **Scientia Agraria Paranaensis** 16:137-144.

Luan VQ, Huy NP et al. (2015) *Ex vitro* and *in vitro* *Paphiopedilum delenatii* Guillaumin stem elongation under light-emitting diodes and shoot regeneration via stem node culture. **Acta Physiologiae Plantarum** 37:136.

Machado Neto NB, Custódio CC (2005) Orchid conservation through Seed Banking: ins and outs. **Selbyana** 26:229-235.

Martini PC, Willadino L, Alves GD, Donato VMTS (2001) Propagação da orquídea *Gongora quinquenervis* por semeadura *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 36:1319-1324.

Massa GD, Kim HH, Wheeler RM, Mitchell CA (2008) Plant productivity in response to LED lighting. **HortScience** 43:1951-1956.

Melo GM, Paulino PMS, Willadino LG, Camara TR, Ulisses C (2015) Asymbiotic germination of the genus *Cattleya* in different nutritive media. **Plant Cell Culture Micropropagation** 11:19-26.

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.

Motomura H, Yukawa T, Ueno O, Kagawa A (2008) The occurrence of crassulacean acid metabolism in *Cymbidium* (Orchidaceae) and its ecological and evolutionary implications. **Journal of Plant Research** 121:163-177.

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologic Plantarum** 15:473-497.

Nhut DT, Tung HT, Tanaka M (2018) Understanding Seed and Protocorm Development in Orchids. In: Lee, YI. and ET. Yeung (eds.). **Orchid Propagation: From Laboratories to Greenhouses-Methods and Protocols. Springer Protocols Handbooks**. Humana Press: New York p. 209-223.

Olle M, Virsilè A (2013) The effects of light-emitting diode lighting on greenhouse plant growth and quality. **Agricultural and food science** 22:223-234.

Popova E, Kim HH, Saxena PK, Engelmann F, Pritchard HW (2016) Frozen beauty: The cryobiotechnology of orchid diversity. **Biotechnology advances** 34:380-403.

Ramírez-Mosqueda MA, Iglesias-Andreu LG, Bautista-Aguilar JR (2017) The effect of light quality on growth and development of *in vitro* plantlet of *Stevia rebaudiana* Bertoni. **Sugar Tech** 19:331-336.

Rasmussen HN, Dixon KW, Jersáková J, Těšitelová T (2015) Germination and seedling establishment in orchids: a complex of requirements. **Annals of Botany** 116:391-402.

Reed BM (2008) **Plant cryopreservation: a practical guide**. New York: Springer, 513p.

Sakai A, Kobayashi S, Oiyama I (1990) Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. **Plant Cell Reports** 9:30-33.

Santos IR (2000) Criopreservação: potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal** 12:70-84.

Schinini A (2010). Orquídeas nativas del Paraguay. **Rojasiana** 9:1-316.

Schneiders D, Pescador R, Booz MR, Suzuki RM (2012) Germinação, crescimento e desenvolvimento *in vitro* de orquídeas (*Cattleya* spp., Orchidaceae). **Revista Ceres** 59:185-191.

Seaton PT, Hu H, Perner H, Pritchard HW (2010). *Ex situ* conservation of orchids in a warming world. **The botanical review** 76:193-203.

Silva JAT, Dobránszki J, Ross S (2013) Phloroglucinol in plant tissue culture. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant** 49:1-16.

Silva JAT, Kerbauy GB, Zeng S, Chen Z, Duan J (2014) *In vitro* flowering of orchids. **Critical reviews in biotechnology** 34:56-76.

Silva JAT, Tsavkelova EA, Zeng S, Ng TB, Parthibhan S, Dobránszki J, Cardoso JC, Rao MV (2015) Symbiotic *in vitro* seed propagation of *Dendrobium*: fungal and bacterial partners and their influence on plant growth and development. **Planta** 242:1-22.

Soares JS, Rosa Y, Macedo M, Sorgato J, Rosa D, Rosa C (2012) Cultivo *in vitro* de *Brassavola tuberculata* (Orchidaceae) em meio de cultura alternativo suplementado com diferentes concentrações de açúcar e carvão ativado. **Magistra** 24:226-233.

Stewart SL, Kane ME (2006) Asymbiotic seed germination *in vitro* seedling development of *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae), a rare Florida terrestrial orchid. **Plant Cell Tissue Organ Culture** 86:147-158.

Suzuki ABP, Vidal TCM, Alves GAC, Junior DB, Biz G, Sorace M, Faria RT (2018) Cryopreservation of Brazilian orchid ('*Catasetum atratum*' Lindl.) seed at risk of extinction. **Australian Journal of Crop Science** 12:1051.

Suzuki RM, Almeida V, Pescador R, Ferreira WM (2010) Germinação e crescimento *in vitro* de *Cattleya bicolor* Lindley (Orchidaceae). **Hoehnea** 37:731- 742.

Suzuki RM, Moreira VC, Nakabashi M, Ferreira WDM (2009) *In vitro* germination and growth of *Hadrolaelia tenebrosa* (Rolfe) Chiron & VP Castro (Orchidaceae), an endangered species of the Brazilian flora. **Hoehnea** 36:657-666.

Tanaka M, Takamura T, Watanabe H, Endo M, Yanagi T, Okamoto K (1998) *In vitro* growth of Cymbidium plantlets cultured under superbright red and blue light-emitting diodes (LEDs). **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology** 73:39-44.

Tsai WC, Dievart A, Hsu CC, Hsiao YY, Chiou SY, Huang H, Chen HH (2017) Post genomics era for orchid research. **Botanical studies** 58:61.

Vacin EF, Went FW (1949) Some pH changes in nutrient solutions. **Botanical Gazette** 110:605-613.

van den Berg C, Carnevali G (2005) Encyclia Hook. In: Pridgeon A, Cribb P, Chase M. Rasmussen F (Eds.) **Genera Orchidacearum**. Vol. 5., Oxford: Oxford University, p.232–236.

Vendrame WA (2018) Cryopreservation. In: Lee YI, Yeung ET (eds.). **Orchid Propagation: From Laboratories to Greenhouses-Methods and Protocols**. Springer Protocols Handbooks. Humana Press, New York, NY. 282-302 p.

Vendrame WA, Carvalho VS, Dias JMM, Maguire I (2008) Pollination of *Dendrobium* hybrids using cryopreserved pollen. **HortScience** 43:264–267.

Vendrame WA, Faria RT (2011) Phloroglucinol enhances recovery and survival of cryopreserved *Dendrobium nobile* protocorms. **Scientia Horticulturae** 12:131-135.  
 Vendrame WA, Faria RT, Sorace M, Sahyun SA (2014) Orchid cryopreservation. **Ciência e Agrotecnologia** 38:213-229.

Vendrame WA, Khoddamzadeh AA (2017) Orchid biotechnology. **Horticultural Reviews** 44:173-228.

Vidoz ML, Flachslan EA, Rey HY, Mroginski LA (1999) Comportamiento *ex vitro* de plantas de *Brassavola perrinii* (Orchidaceae) y de três híbridos intergenéricos. **Ciencia y técnica** 5:13-16.

Wang B, Wang RR, Cui ZH, Bi, WL, Li JW, Li BQ (2014) Potential applications of cryogenic technologies to plant genetic improvement and pathogen eradication. **Biotechnology advances** 32:583-595.

Yeh N, Chung JP (2009) High-brightness LEDs—Energy efficient lighting sources and their potential in indoor plant cultivation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** 13:2175-2180.

Yeung EC, Li Y, Lee Y (2018) Understanding Seed and Protocorm Development in Orchids. In: Lee, YI. and ET. Yeung (eds.). **Orchid Propagation: From Laboratories to Greenhouses-Methods and Protocols. Springer Protocols Handbooks**. New York: Humana Press. p.3-26.

Zotz G (2013) The systematic distribution of vascular epiphytes a critical update. **Botanical Journal of the Linnean Society** 171:453-481.

## CAPÍTULO 2 - Lâmpada fluorescente ou LEDs, e qual formulações de meio de cultivo utilizar na germinação e no desenvolvimento *in vitro* de *Brassavola perrinii*?

**RESUMO** - O aperfeiçoamento de técnicas de propagação *in vitro*, com auxílio da escolha adequada da fonte de luz artificial e das formulações do meio de cultivo, são importantes, pois viabilizam a produção em massa de indivíduos com grande variabilidade genética. Assim, o presente estudo teve por objetivos estudar fontes de luz a partir de lâmpadas fluorescentes e diodos emissores de luz (LEDs) e formulações de meio de cultivo na germinação e no desenvolvimento inicial da espécie de orquídea *Brassavola perrinii*. O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado; os tratamentos foram arranjos em esquema fatorial 5x4 sendo cinco fontes de luz: LF - lâmpada fluorescente (100%); LB - LED branco (100%); LA - LED azul (100%); LV- LED vermelho (100%) e LAV – I LED azul (50%) e vermelho (50%), e quatro formulações de meio de cultivo (MS (Murashige e Skoog, 1962); ½ MS (MS na metade da concentração de sais); VW (Vacin e Went, 1949) e K (Knudson, 1946)), com quatro repetições e média de 125 sementes por parcela. Aos 90 dias após a semeadura foram avaliadas a porcentagem de germinação, porcentagem de protocormos clorofilados e o desenvolvimento dos protocormos através das classes: P1, P2, P3 e P4 para cálculo do índice de desenvolvimento protocormos. Os dados foram submetidos à análise de variância e aqueles com valor percentual foram previamente transformados em arco-seno  $(x/100)^{1/2}$ . As médias foram comparadas pelo teste de Tukey  $p < 0,05$ . Para *B. perrinii*, concluiu-se que o percentual de germinação não foi influenciado pelos espectros de luz, mas foi maior nas formulações ½ MS e VW. O maior índice de desenvolvimento dos protocormos de *B. perrinii* foi observado quando submetidos ao espectro de luz da fonte de iluminação com lâmpadas fluorescentes em meio de cultivo Vacin e Went.

**Palavras-chave:** *Brassavola perrinii*, fontes de luz, meio de cultivo, protocormo, semente *in vitro*

### 2.1 Introdução

Orchidaceae é a segunda maior família de plantas com flores (Chase et al., 2015). Estima-se que o número de gêneros esteja entre 559 a 880 e de espécies entre 18.814 a 30.000 (Givnish et al., 2015; Hsiao et al., 2011; Zotz, 2013). As orquídeas são plantas com características ornamentais, apresentando relevante importância econômica, sendo conhecidas, apreciadas, utilizadas e comercializadas em diferentes partes do mundo (Popova et al., 2016).

*Brassavola* é um gênero que se destaca entre os principais encontrados no Brasil (Faria et al., 2012) e, principalmente pela sua capacidade de inter cruzar-se com

diferentes gêneros como *Cattleya*, *Laelia*, *Sophronitis* e *Epidendrum* (Soares et al., 2012), possibilita a obtenção de híbridos com características morfológicas de interesse maior até mesmo do que as dos próprios progenitores (Vidoz et al., 1999).

De acordo com Martini et al. (2001), a semeadura assimbiótica de orquídeas constitui técnica bastante relevante do ponto de vista comercial e ecológico, pois, as sementes contêm embrião rudimentar, com pouca reserva nutritiva (Arditti, 1992). Por essa razão, em ambiente natural a semente depende exclusivamente de associação com fungos micorrízicos específicos para conseguir germinar e completar a fase de desenvolvimento do protocormo (Agustini et al., 2009).

A luz é um fator importante na regulação do crescimento e desenvolvimento de plantas e seu espectro deve atender às exigências da planta para a fotossíntese e o desenvolvimento fotomorfogênico (Silva, 2014). A comunidade científica aceita a hipótese de que a necessidade de luz varia de acordo com o habitat de cada espécie em suas respectivas condições naturais (Kauth et al., 2008).

Entre as fontes de radiação luminosa, comumente utilizadas em ambientes controlados de crescimento de plantas, está a lâmpada fluorescente (Bula et al., 1991). Entretanto, uma alternativa de fonte luminosa que vem sendo utilizada nos laboratórios de cultivo *in vitro* os chamados diodos emissores de luz (LEDs) (Yeh e Chung, 2009). Esses apresentam uma série de vantagens em relação aos sistemas de iluminação tradicional, como por exemplo: longa durabilidade, redução do consumo de energia elétrica, circuitos eletrônicos mais simples e mais confiáveis e menor emissão de calor (Massa et al., 2008), além de, tamanho reduzido, comprimento de onda específico, intensidade e qualidade de luz ajustáveis (Yeh e Chung, 2009).

A utilização de lâmpadas fluorescentes é uma realidade em muitos laboratórios comerciais e de pesquisa, porém, estudos com a utilização de LEDs na produção agrícola vem ganhando espaço. A utilização de sistemas de iluminação com LEDs já foi estudado e apresentou resultados atrativos para algumas espécies de orquídeas, como: *Cymbidium* (Tanaka et al., 1998; Nhut et al., 2018), *Bletilla ochracea* (Godo et al., 2011), *Oreorchis patens* (Bae et al., 2014), *Calanthe discolor* (Bae et al., 2015), *Paphiopedium elongato* (Luan et al., 2015), *Microlaelia lundii* (Favetta et al., 2017) e *Phalaenopsis* (Nhut et al., 2018).

Outro fator importante para o sucesso do cultivo assimbiótico *in vitro* é a escolha da formulação do meio de cultivo, pois esse deve fornecer todas as características necessárias para a germinação (Soares et al., 2012). A exigência nutricional varia não apenas para cada espécie de orquídeas, mas também para cada fase de desenvolvimento das plântulas (Jorge et al., 2015).

As formulações para os meios de cultivo utilizados na germinação e desenvolvimento de orquídeas são compostas por macro e micronutrientes, vitaminas e sais minerais (Murashige e Skoog, 1962). O meio mais utilizados para a semeadura e no cultivo *in vitro* de orquídeas é o MS (Murashige e Skoog, 1962), VW (Vacin e Went, 1949) e K (Knudson, 1946), mas não há relatos na literatura de qual seria o melhor para *Brassavola perrinii*.

Assim, o presente estudo teve por objetivos estudar fontes de luz a partir de lâmpadas fluorescentes e diodos emissores de luz (LEDs) e formulações de meio de cultivo na germinação e no desenvolvimento inicial da espécie de orquídea *Brassavola perrinii*.

## 2.2 Material e Métodos

O experimento foi realizado entre dezembro de 2017 a março de 2018, no laboratório de cultivo *in vitro* da Faculdade de Ciências Agrárias (FCA) da Universidade Federal Grande Dourados (UFGD). Foram utilizadas sementes de *Brassavola perrinii* provenientes de polinização artificial. Foi colhida uma cápsula madura da qual foram removidas as sementes, e dessecadas por 14 dias em dessecador com sílica gel ( $25 \pm 2$  °C; 75% UR), posteriormente embaladas em papel alumínio e armazenados sob refrigeração ( $5 \pm 2$  °C).

Antes da instalação do experimento foi realizada a avaliação da viabilidade inicial das sementes através do teste de tetrazólio (cloreto de 2,3,5-trifenol tetrazólio) segundo metodologia de Hosomi et al. (2012). Foram utilizadas 0,002 g de sementes, divididas em três repetições, sendo cada repetição composta por cerca de 500 sementes. As sementes foram contadas com auxílio de estereoscópio e foram consideradas viáveis as que apresentaram coloração vermelho-rosada. Foi

mensurado o tamanho das sementes por meio do comprimento (mm) x largura (mm) em microscópio eletrônico, com auxílio do software Spot Basic.

Para a semeadura dos tratamentos, foram pesadas amostras de 0,005 g de sementes para cada tratamento. Em câmara de fluxo laminar as sementes passam por desinfestação com etanol 70% (1 min) seguido de hipoclorito de sódio a 0,8% (5 min). Após esse período foi realizada a tríplex lavagem com água destilada autoclavada (1 min cada) e o volume foi completado para 100 ml com água destilada estéril para a realização da semeadura *in vitro*. A semeadura foi realizada com o auxílio de um pipetador automático, com o qual foram inoculados 1 ml da suspensão de sementes por parcela, com média de 125 sementes cada.

A semeadura foi realizada em quatro formulações de meio de cultivo: MS (Murashige e Skoog, 1962);  $\frac{1}{2}$  MS (MS na metade da concentração de sais); VW (Vacin e Went, 1949) e K (Knudson, 1946). Os meios de cultivo antes da semeadura foram solidificados com 6,4 g L<sup>-1</sup> de ágar e suplementados com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose. O pH foi ajustado a 5,8 com auxílio de HCl (0,1 M) ou KOH (0,1 M), quando necessário. Os meios de cultivo foram distribuídos em frascos de polipropileno com capacidade de 50 ml, sendo cada frasco completado com 20 ml de meio de cultivo e, vedados com três camadas de filme PVC. Os frascos foram autoclavados a 120 °C à 1 atm por 20 minutos.

Os tratamentos foram acondicionados em sala de crescimento com fotoperíodo de 16/8, temperatura mantida a 25 ± 2 °C e irradiância de 30  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  em cinco fontes de luz: LF - lâmpada fluorescente (100%) 440 - 550 nm; LB - LED branco (100%) 440 - 550 nm; LA - LED azul (100%) 460 nm; LV- LED vermelho (100%) 630 nm e LAV – I LED azul (50%) e vermelho (50%), 450 nm e 630 nm. O espectro luminoso foi medido com auxílio do espectrômetro portátil Ocean Optics (Modelo MMO com fibra ótica). Todo o experimento foi duplicado.

Após 90 dias da semeadura, foi realizado o estudo de germinação das sementes, em que, foi avaliada a porcentagem de germinação e porcentagem de protocormos clorofilados. A avaliação foi realizada através da retirada do material contido nos frascos, com água destilada, e acondicionados em placas de acrílico (2,0 x 2,0 x 0,5 cm), quadriculadas (0,5 x 0,5 cm), com auxílio de microscópio estereoscópico binocular com zoom, para melhor visualização do material.

O desenvolvimento dos protocormos foi avaliado, segundo a metodologia de Suzuki et al. (2009), em que os protocormos foram classificados segundo a classes morfológicas: estágio P1 - protocormos entumecidos clorofilados; estágio P2 - protocormos com formação da primeira folha; estágio P3 - protocormos com duas folhas e estágio P4 - protocormos com folhas e uma ou mais raízes.

Com os dados da avaliação morfológica dos protocormos foi calculado o índice de desenvolvimento dos protocormos segundo metodologia de Spoerl (1948), cada repetição foi multiplicada pelos pesos 1, 2, 3 e 4, de acordo com os respectivos estádios. O índice de cada repetição foi obtido pela média da somatória de todos os estádios de desenvolvimento nelas presentes.

Foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado e os tratamentos foram arranjos em esquema fatorial 5x4 (fontes de luz x meios de cultivo), com quatro repetições cada. Os dados foram submetidos à análise de variância e aqueles com valor percentual foram previamente transformados em arco-seno  $(x/100)^{1/2}$ . Foram mantidas as médias originais, as quais foram comparadas pelo teste de Tukey  $p < 0,05$ . As análises foram realizadas no programa estatístico AgroEstat (Barbosa e Maldonado Júnior, 2015).

## 2.3 Resultados

As sementes apresentam comprimento médio de 0,46 mm e largura de 0,10 mm, a viabilidade inicial foi de 83,97 % (Tabela 1).

Tabela 1. Biometria e viabilidade inicial das sementes de *Brassavola perrinii*.

| Características das sementes  | <i>Brassavola perrinii</i> |
|-------------------------------|----------------------------|
| Comprimento das sementes (mm) | 0,46 ± 0,13 <sup>a</sup>   |
| Largura das sementes (mm)     | 0,10 ± 0,01                |
| Viabilidade inicial – TTC (%) | 83,97 <sup>b</sup>         |

<sup>a</sup> Média de 50 sementes. <sup>b</sup> Média de 1500 sementes.

Não houve interação entre os fatores fonte de luz e tipo de meio de cultivo na porcentagem de germinação. Para a variável porcentagem de protocormos

clorofilados, foi possível verificar o efeito isolado das fontes de luz e formulações de meio de cultivo. Independente da fonte de luz, a maior porcentagem de germinação de sementes de *B. perrinii* foi observada para o meio de cultivo Vacin e Went (98,51%) e para o meio ½ MS (98,00%). O meio de cultivo que propiciou maior porcentagem de protocormos clorofilados, ou seja, vivos, foi o meio de cultivo ½ MS (51,23%) (Tabela 2).

Tabela 2. Influência de formulações de meio de cultivo sobre porcentagem de germinação e porcentagem de protocormos clorofilados a partir do semeio *in vitro* de *Brassavola perrinii*, 90 dias após a semeadura.

| Meios de cultivo | Germinação (%) <sup>1</sup> | Protocormos clorofilados (%) <sup>1</sup> |
|------------------|-----------------------------|-------------------------------------------|
| MS               | 96,71 bc                    | 31,00 c                                   |
| ½ MS             | 98,00 ab                    | 51,23 a                                   |
| VW               | 98,51 a                     | 39,78 b                                   |
| K                | 96,52 c                     | 38,53 b                                   |
| CV (%)           | 3,65                        | 5,10                                      |

<sup>1</sup>Dados transformados em arco-seno (x/100)<sup>1/2</sup> e médias originais apresentados na tabela. Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey p<0,05. MS (Murashige e Skoog, 1962); ½ MS (MS na metade da concentração de sais); VW (Vacin e Went, 1949) e K (Knudson, 1946). CV – Coeficiente de variação.

Foi observada 42,39% de protocormos clorofilados quando submetidos à luz LED branca, média essa que não diferiu significativamente da lâmpada fluorescente, nem dos tratamentos com fonte de luz LED azul (100%) e vermelho (100%), em que foram observadas médias de 39,44%, 40,63% e 40,61%, respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3. Influência da fonte luminosa sobre a porcentagem de protocormos clorofilados a partir do semeio *in vitro* de *Brassavola perrinii*, 90 dias após a semeadura.

| Porcentagem de protocormos clorofilados <sup>1</sup> |         |          |          |         | CV (%) |
|------------------------------------------------------|---------|----------|----------|---------|--------|
| LF                                                   | LB      | LA       | LV       | LAV     |        |
| 39,44 ab                                             | 42,39 a | 40,63 ab | 40,61 ab | 37,63 b | 5,10   |

<sup>1</sup>Dados transformados em arco-seno (x/100)<sup>1/2</sup> e médias originais apresentados na tabela. Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha não diferem entre si pelo teste Tukey p < 0,05. LF - Lâmpada fluorescente (100%); LB - LED branco (100%); LA - LED azul (100%); LV - LED vermelho (100%) e LAV - LED azul (50%) e vermelho (50%). CV - Coeficiente de variação.

O melhor índice de desenvolvimento dos protocormos (284) foi observado no tratamento com lâmpadas fluorescentes em interação com a formulação Vacin e Went. No entanto, entre os tratamentos em que foi utilizada fontes de luz LED observou-se o maior índice de desenvolvimento dos protocormos (250) no tratamento com a combinação de LEDs azul (50%) com vermelha (50%) em interação com Vacin e Went (Figura 1).

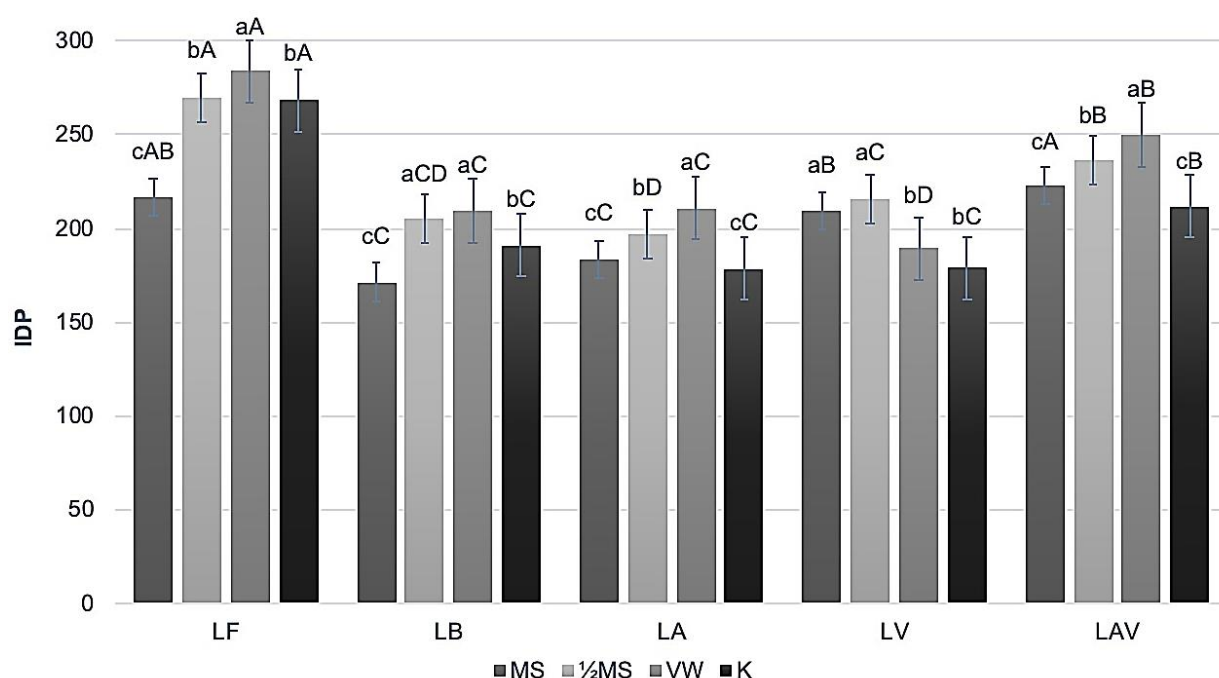


Figura 1. Índice de desenvolvimento de protocormos (IDP) 90 dias após a semeadura da espécie *Brassavola perrinii*. Nas barras letras minúsculas compraram os meios de cultivo e maiúsculas as fontes de luz, pelo teste Tukey  $p < 0,05$ . LF - Lâmpadas fluorescentes (100%); LB - LED branco (100%); LA - LED azul (100%); LV - LED vermelho (100%), LAV - LED azul (50%) e vermelho (50%). MS (Murashige e Skoog, 1962); 1/2 MS (MS na metade da concentração de sais); K (Knudson, 1946) e VW (Vacin e Went, 1949).

A Figura 2 mostra a densidade de energia espectral relativa para as fontes de luz que foram utilizadas. A lâmpada fluorescente mostrou picos de intensidade de comprimento de ondas discretos, na faixa do azul 440 nm e na faixa do verde 550 nm. O LED branco mostrou os mesmos picos que a lâmpada fluorescente, porém em formato de sino aberto, picos de 440 nm e 550 nm. Os LEDs mostraram a formação de uma curva em formato de sino sinuosa dentro de suas respectivas faixas

espectrais, sendo LED azul 460 nm e o LED vermelho 630 nm e para a combinação dos LED azul e vermelho dois picos, que ficaram em 450 nm e 630 nm.

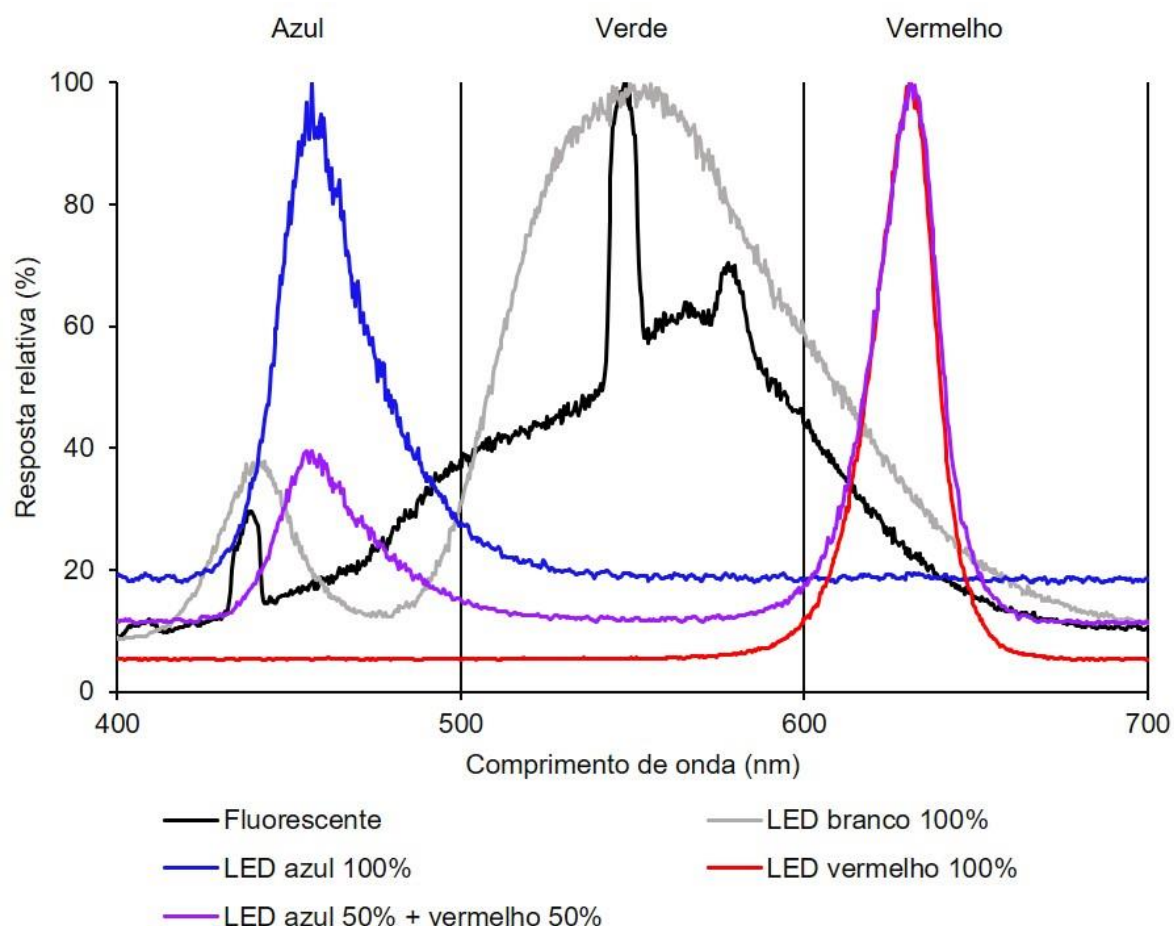


Figura 2. Distribuição da energia espectral relativa (%) de lâmpadas fluorescentes e diodos emissores de luz (LEDs).

## 2.4 Discussão

Independente do espectro luminoso, as médias de porcentagem de germinação, para *Brassavola perrinii*, caracterizada como uma espécie epífita, foram superiores a 96,52%, não interferindo nessa variável. Resultados semelhantes foram observados em *Bletilla ochracea* em que a resposta a germinação, sob diferentes fontes de luz LED, foi indiferente (Godo et al., 2011). Diferentemente, ao estudar a orquídea terrícola *Oreorchis patens*, Bae et al. (2014) observaram maior porcentagem de germinação (90,9%), quando submetida a luz LED vermelha. Esses resultados

sugerem que a fonte de luz artificial não é um fator limitante para a germinação de *Brassavola perrinii*.

As formulações que propiciaram maior porcentagem de germinação,  $\frac{1}{2}$  MS (98,00%) e Vacin e Went (98,51%), para *Brassavola perrinii*, foram as mesmas que favoreceram a maior porcentagem de germinação para *Cattleya nobilior* (Macedo, 2013), enquanto Alves (2018) observou 62,21% de germinação em meio  $\frac{1}{2}$  MS para a espécie *Brassavola martiana*, sendo esse o melhor resultado.

Ao avaliar a germinação *in vitro* da espécie *Cattleya labiata*, assim como dos híbridos de *Cattleya violacea* estriata pedrinho x *Cattleya violacea* pedrinho e *Cattleya violacea* Pedrinho x *Cattleya violácea*, Melo et al. (2015) observaram que o meio  $\frac{1}{2}$  MS é mais favorável do que o meio MS. A melhor resposta à porcentagem de germinação em meio Vacin e Went também foi observada no estudo das espécies *C. bicolor* (Suzuki et al., 2010) e *Calopogon tuberosus* var. *tuberosus* (Kauth et al., 2008).

As médias de porcentagem de protocormos clorofilados foram estatisticamente iguais para a faixa espectral proveniente das fontes luminosas: lâmpadas fluorescentes, LED branco, LED azul e LED vermelho. Resultados diferentes foram observados por Bae et al. (2014), que, ao comparar as fontes de luz LED branca, vermelha e azul, verificaram que a maior porcentagem de formação de protocormos (94,1%), ocorreu sob luz LED vermelha para a orquídea terrícola *Oreorchis patens*.

A formulação que propiciou maior porcentagem de protocormos clorofilados foi o  $\frac{1}{2}$  MS (51,23%). O mesmo resultado foi observado em outros estudos com as espécies de orquídea: *C. nobilior* (Macedo, 2013), *C. labiata* (Melo et al., 2015) e *B. martiana* (Alves, 2018). Nesses trabalhos, a porcentagem de germinação está diretamente associada à porcentagem de protocormos clorofilados. Possivelmente, essa maior porcentagem de sobrevivência pode estar relacionada à concentração ideal de nitrogênio total (30,03 mmol L<sup>-1</sup>) e de potássio (10,3 mmol L<sup>-1</sup>) da formulação  $\frac{1}{2}$  MS, para essa variável.

O maior índice de desenvolvimento dos protocormos foi observado sob lâmpadas fluorescentes em interação com a formulação de meio de cultivo Vacin e Went (284). Esse resultado pode ser atribuído às características dessa fonte luminosa, pois, emitem um amplo espectro luminoso, com picos na faixa espectral do azul 440 nm e do verde 550 nm. De acordo com estudos recentes, a micropropagação de

orquídeas pode ser significativamente melhorada pelo uso de luz na faixa espectral do verde.

A luz verde estimulou a produção de PLBs ou organogênese de duas cultivares de *Cymbidium* (Nahar et al., 2016). Além disso, essa faixa espectral em uma combinação com LEDs vermelhos ou com lâmpadas fluorescentes pode melhorar significativamente a regeneração de *Cymbidium* Waltz 'Idol' (Kaewjampa e Shimasaki, 2012).

No entanto, Johkan et al. (2012) ao cultivarem alface sob LEDs, com diferentes picos dentro da faixa espectral do verde: 510, 524 e 532 nm, e controles com lâmpadas fluorescentes, observaram que as plantas de alface se desenvolveram normalmente e cresceram mais rápido quando cultivadas sob lâmpadas fluorescentes do que as plantas cultivadas sob os LEDs. Esses resultados mostram que a ausência e a variação da quantidade de incidência de luz na faixa do verde podem influenciar no desenvolvimento e crescimento de diferentes espécies.

No presente estudo pode-se observar que o segundo maior resultado para o índice de desenvolvimento dos protocormos ocorreu sob o tratamento com a combinação de LEDs azul 50% e vermelho 50% (250), que apresentava picos de 450 nm e 630 nm, sem picos na banda do verde. Kim et al. (2004) adicionaram 24% de luz verde (500 a 600 nm) aos LEDs vermelhos e azuis, essa proporção de verde promoveu um aumento no crescimento de plantas de alface e maior produção de biomassa do que as plantas cultivadas sob as lâmpadas fluorescente.

Diferente ao aqui relatado, Nhut et al. (2018) observaram que o desenvolvimento de plântulas dos gêneros epifíticos *Phalaenopsis* e *Cymbidium* sob tratamentos com fontes de lâmpada fluorescente e LEDs azul, vermelho e a combinação de azul com vermelho, apresentaram resposta positiva quanto ao crescimento das plântulas na combinação de LEDs azul com vermelho, e recomendaram a aplicação dessa fonte de luz na micropropagação dessas espécies. Os mesmos autores verificaram que a utilização de sistema de iluminação somente com LEDs foi eficaz para o processo fotossintético. Por outro lado, assim como os resultados observados no presente estudo, a luz LED vermelha ou azul monocromáticas foi prejudicial na produção de PLBs de nove cultivares híbridas de *Cymbidium* (Silva, 2014).

Já em relação a melhor resposta do índice de desenvolvimento dos protocormos ter sido observada em Vacin e Went (1949), pode ser atribuída ao fato de que na fase de protocormo não há a ocorrência de uma alta exigência nutricional (Jorge et al., 2015). Outro ponto importante é que, essa formulação foi originalmente proposta com o objetivo de ser utilizado para semeadura e desenvolvimento assimbiótico de orquídeas. Estudos sobre o desenvolvimento dos protocormos das espécies *Hadrolaelia tenebrosa* (Suzuki et al., 2009), *Cattleya bicolor* (Suzuki et al., 2010), *Cattleya warneri* (Jorge et al., 2015), e *Catasetum macrocarpum* (Ferreira et al., 2018), também constataram que o meio Vacin e Went viabilizou a obtenção desse material em estádios mais avançados de desenvolvimento quando comparado a outros meios de cultivo, resultados estes que também corroboram os resultados aqui obtidos.

Em resumo, o tratamento com lâmpadas fluorescentes e formulação de meio de cultivo Vacin e Went foi o mais indicado para o desenvolvimento inicial da espécie de orquídea *B. perrinii*. Embora as lâmpadas fluorescentes tenham apresentado os melhores resultados, a combinação dos LEDs azul 50% e vermelho 50% mostrou o segundo melhor resultado. Esses resultados permitem sugerir que novos estudos com diferentes combinações de LEDs, branco, azul e vermelho que abrangem todas as faixas do espectro visível, podem ser realizados, visto que o emprego dessa fonte luminosa apresenta vantagens como, radiação significativamente mais eficiente para as plantas e, portanto, menos luminárias e custo reduzido de eletricidade (Nelson e Bugbee, 2014).

## 2.5 Conclusão

Para *Brassavola perrinii*, concluiu-se que o percentual de germinação não foi influenciado pelos espectros de luz, mas foi maior nas formulações ½ MS e VW. O maior índice de desenvolvimento dos protocormos de *Brassavola perrinii* foi observado quando submetidos ao espectro de luz da fonte de iluminação com lâmpadas fluorescentes em meio de cultivo Vacin e Went.

## 2.6 Referências

- Agustini V, Sufaati S, Suharno S (2009) Mycorrhizal Association of Terrestrial Orchids of Cycloops Nature Reserve, Jayapura. **Biodiversitas Journal of Biological Diversity** 10:175-180.
- Alves LR (2018) **Análise da propagação e desenvolvimento inicial *in vitro*, e aclimatização de *Brassavola martiana* Lindl (Orchidaceae).** 42 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia) – UFT, Porto Nacional.
- Arditti J (1992) **Fundamentals of orchid biology** New York: John Wiley & Sons. 691p.
- Bae KH, Oh KH, Kim SY (2014) Sodium hypochlorite treatment and light-emitting diode (LED) irradiation effect on *in vitro* germination of *Oreorchis patens* (Lindl.) Lindl. **Journal of Plant Biotechnology** 41:44-49.
- Bae KH, Oh KH, Kim SY (2015) *In vitro* seed germination and seedling growth of *Calanthe discolor* Lindl. **Plant Breeding and Seed Science** 71:109–119.
- Barbosa JC, Maldonado Júnior JRW (2015) **AgroEstat: sistema para análises estatísticas de ensaios agrônômicos.** Versão 1.1.0.711. Jaboticabal: Funep. 396p.
- Bula RJ, Morrow RC, Tibbitts TW, Barta, DJ, Ignatius RW, Martin TS (1991) Light-emitting diodes as a radiation source for plants. **HortScience** 26:203-205.
- Chase MW, Cameron KM, Freudenstein JV, Pridgeon AM, Salazar G, van den Berg C, Schuiteman A (2015) An updated classification of Orchidaceae. **Botanical journal of the Linnean Society** 177: 151-174.
- Faria RT, Assis AM, Unemoto LK, Carvalho JFRP (2012) **Produção de orquídeas em laboratório** Londrina: Mecenias, 124p.
- Favetta V, Colombo RC, Mangili Júnior JF, Faria RT (2017) Light sources and cultural media in the *in vitro* growth of the Brazilian orchid *Microlaelia lundii*. **Semina** 38:1775-1784.
- Ferreira WM, Oliveira SP, Suzuki RM, Silva KLF, Soares Júnior JWP (2018) Germination, growth and morpho-anatomical development of *Catasetum macrocarpum* (Orchidaceae) *in vitro*. **Rodriguésia** 69:2137-2151.
- Givnish TJ, Spalink D et al. (2015) Orchid phylogenomics and multiple drivers of their extraordinary diversification. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences** 282:20151553.
- Godo T, Fujiwara K, Guan K, Miyoshi K (2011) Effects of wavelength of LED-light on *in vitro* asymbiotic germination and seedling growth of *Bletilla ochracea* Schltr. (Orchidaceae). **Plant Biotechnology** 28:397–400.

Hosomi ST, Custódio CC, Seaton PT, Marks TR, Machado-Neto NB (2012) Improved assessment of viability and germination of *Cattleya* (Orchidaceae) seeds following storage. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant** 48:127-136.

Hsiao YY, Pan ZJ, Hsu CC, YangYP, Hsu YC, Chuang YC, Shih HH, Chen WH, Tsai WC, Chen HH (2011) Research on orchid biology and biotechnology. **Plant and Cell Physiology** 52:1467-1486.

Johkan M, Shoji K, Goto F, Hahida S, Yoshihara T (2012) Effect of green light wavelength and intensity on photomorphogenesis and photosynthesis in *Lactuca sativa*. **Environmental and Experimental Botany** 75:128–133.

Jorge J, Abrão MCR, Suzuki RM (2015) Germinação e crescimento inicial in vitro de *Cattleya warneri* T. Moore (Orchidaceae). **Revista Brasileira de Biociências** 13:134-141.

Kaewjampa N, Shimasaki K (2012) Effects of green LED lighting on organogenesis and superoxide dismutase (SOD) activities in protocorm-like bodies (PLBs) of *Cymbidium* cultured *in vitro*. **Environmental Control in Biology** 50:247–254.

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.

Kim HH, Goins G, Wheeler R, Sager JC, Yorio NC (2004) Green-light supplementation for enhanced lettuce growth under red and blue LEDs. **HortScience** 39:1616–1622.

Knudson L (1946) A new nutrient solution for the germination of orchid seed. **American Orchid Society Bulletin** 15: 214-217.

Luan VQ, Huy NP, Nam NB, Huong TT, Hien VT, Hien NTT, Hien NTT, Hai NT, Thinh DK, Nhut DT (2015) *Ex vitro* and *in vitro* *Paphiopedilum delenatii* Guillaumin stem elongation under light-emitting diodes and shoot regeneration via stem node culture. **Acta Physiologiae Plantarum** 37:136.

Macedo MC (2013) **Germinação assimbiótica e crescimento inicial de *Cattleya nobilior* RCHB.F (Orchidaceae)**. 86 f. Tese (Doutorado em Agronomia - Produção Vegetal) – UFGD, Dourados.

Martini PC, Willadino L, Alves GD, Donato VMTS (2001) Propagação de orquídea *Gongora quinquenervis* por sementeira *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 36:1319-1324.

Massa GD, Kim HH, Wheeler RM, Mitchell CA (2008) Plant productivity in response to LED lighting. **HortScience** 43:1951-1956.

Melo GM, Paulino PMS, Willadino LG, Camara TR, Ulisses C (2015) Asymbiotic germination of the genus *Cattleya* in different nutritive media. **Plant Cell Culture & Micropropagation** 11:19-26.

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum** 15:473-497.

Nahar SJ, Haque SM, Kazuhiko S (2016) Application of chondroitin sulfate on organogenesis of two *Cymbidium* spp. under different sources of lights. **Notulae Scientia Biologicae** 8:156–160.

Nelson J, Bugbee B (2014) Economic analysis of greenhouse lighting: light emitting diodes vs. high intensity discharge fixtures. **PLoS ONE** 9: e99010.

Nhut DT, Tung HT, Tanaka M (2018) Understanding Seed and Protocorm Development in Orchids. In: Lee YI, Yeung ET (Eds.). **Orchid Propagation: from Laboratories to Greenhouses-Methods and Protocols. Springer Protocols Handbooks**. New York: Humana Press p. 209-223.

Popova E, Kim HH, Saxena PK, Engelmann F, Pritchard HW (2016) Frozen beauty: The cryobiotechnology of orchid diversity. **Biotechnology advances** 34:380-403.

Silva JAT (2014) The response of protocorm-like bodies of nine hybrid *Cymbidium* cultivars to light-emitting diodes. **Environmental and Experimental Biology** 12:155–159.

Soares JS, Rosa YBCJ, Macedo MC, Sorgato JC, Rosa DBCJ, Rosa CBCJ (2012) Cultivo *in vitro* de *Brassavola tuberculata* (Orchidaceae) em meio de cultura alternativo suplementado com diferentes concentrações de açúcar e carvão ativado. **Magistra** 24:226-233.

Spoerl E (1948) Amino acids as sources of nitrogen for orchid embryos. **American Journal of Botany** 35:88-95.

Suzuki RM, Almeida V, Pescador R, Ferreira WM (2010) Germinação e crescimento *in vitro* de *Cattleya bicolor* Lindley (Orchidaceae). **Hoehnea** 37:731- 742.

Suzuki RM, Moreira VC, Nakabashi M, Ferreira WDM (2009) *In vitro* germination and growth of *Hadrolaelia tenebrosa* (Rolfe) Chiron & VP Castro (Orchidaceae), an endangered species of the Brazilian flora. **Hoehnea** 36:657-666.

Tanaka M, Takamura T, Watanabe H, Endo M, Yanagi T, Okamoto K (1998) *In vitro* growth of *Cymbidium* plantlets cultured under superbright red and blue light-emitting diodes (LEDs). **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology** 73:39-44.

Vacin EF, Went FW (1949) Some pH changes in nutrient solutions. **Botanical Gazette** 110:605-613.

Vidoz ML, Flachsland EA, Rey HY, Mroginski LA (1999) Comportamiento *ex vitro* de plantas de *Brassavola perrinii* (Orchidaceae) y de três híbridos intergenéricos. **Ciencia y técnica** 5:13-16.

Yeh N, Chung JP (2009) High-brightness LEDs - energy efficient lighting sources and their potential in indoor plant cultivation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** 13:2175-2180.

Zotz G (2013) The systematic distribution of vascular epiphytes a critical update. **Botanical Journal of the Linnean Society** 171:453-481.

## CAPÍTULO 3 – Eficiência de crioprotetores na criopreservação de duas espécies de orquídeas das Américas

**RESUMO** - O aperfeiçoamento de técnicas de conservação *ex situ*, como a criopreservação são importantes, pois viabilizam a diminuição da coleta predatória bem como a criação de bancos de germoplasma e de híbridos. No entanto, a conservação de sementes a temperaturas ultrabaixas varia em função da espécie a ser propagada, havendo necessidade da adequação de protocolos para cada uma delas. O objetivo deste estudo foi avaliar a eficiência da solução vitrificante (PVS2) combinada ao floroglucinol 1% em nitrogênio líquido para a criopreservação de sementes maduras das espécies *Encyclia cordigera* e *Epidendrum ciliare*. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado. Foram oito tratamentos: 1) germinação *in vitro* direta; 2) imersão direta em nitrogênio líquido, sem crioprotetores; 3) PVS2 por 60 min; 4) PVS2 por 120 min; 5) PVS2 por 180 min; 6) PVS2 + floroglucinol 1% por 60 min; 7) PVS2 + floroglucinol 1% por 120 min; 8) PVS2 + floroglucinol 1% por 180 min, com cinco repetições e média de 120 sementes por parcela, submetidos a imersão em nitrogênio líquido à temperatura de -196 °C por 72 horas. Foram avaliadas a viabilidade, através do teste de tetrazólio, e a porcentagem de germinação das sementes, antes e após a aplicação dos tratamentos. O teor de água das sementes foi de 8% para *Encyclia cordigera* e 20% para *Epidendrum ciliare*. Aos 45 dias após a recuperação da criopreservação foi avaliado o desenvolvimento dos protocormos através das classes morfológicas P1, P2 e P3. Os dados foram submetidos à análise de variância e aqueles com valor percentual foram previamente transformados em arco-seno  $(x/100)^{1/2}$ . As médias foram comparadas pelo teste de Tukey  $p < 0,05$ . A utilização da solução vitrificante (PVS2) combinado ao floroglucinol 1% foi eficiente na recuperação de sementes criopreservadas em nitrogênio líquido, elevou a porcentagem de germinação e desenvolvimento dos protocormos para as duas espécies em estudo. Os resultados observados indicam o uso de PVS2 combinado com floroglucinol 1% por 60 min para a criopreservação de sementes de *Encyclia cordigera*, e PVS2 com floroglucinol 1% por 180 min para sementes de *Epidendrum ciliare*. O presente estudo também indica que a resposta à criopreservação após o armazenamento à frio é específica da espécie e requer ajustes no tempo de exposição ao PVS2 a 0 °C antes da imersão em nitrogênio líquido.

**Palavras-chave:** *Encyclia cordigera*, *Epidendrum ciliare*, Orchidaceae, PVS2

### 3.1 Introdução

Orchidaceae é o grupo de plantas mais diversificado dentro das angiospermas (Swarts e Dixon, 2009) compreendendo uma família numerosa, com mais de 27.000 espécies (Zotz, 2013), conhecida por sua grande diversidade de flores e distribuição global (Merritt et al., 2014).

O gênero *Encyclia* possui cerca de 250 espécies, distribuídas entre habitats epifíticos e litróficos. *Encyclia cordigera* Dresser é uma das espécies dentro do gênero mais apreciadas devido à beleza de seus labelos rosados e fragrância de suas flores, que se assemelha ao cheiro das rosas. Esta espécie pode ser encontrada no Brasil, mas também em países da América Central e América do Norte. O gênero *Epidendrum* possui aproximadamente 100 espécies, que podem ser epifíticas, terrícolas ou litrofíticas, e dentre elas a espécie *Epidendrum ciliare* L., que pode ser encontrada do sul do México até a parte norte da América do Sul. Cresce em árvores ou rochas, geralmente em pleno sol (Lavarack et al., 2002).

Ambas espécies, *Encyclia cordigera* e *Epidendrum ciliare*, têm sido utilizadas na criação de híbridos intergenéricos, devido à beleza de suas flores e geração de novos materiais vegetais para o mercado de plantas ornamentais, sempre ávido por novos híbridos.

A biotecnologia oferece duas técnicas para a conservação de espécies vegetais, sendo elas a conservação *in vitro* e a criopreservação (Vendrame e Khoddamzadeh, 2017). A criopreservação representa um dos pilares da conservação *ex situ* da biodiversidade, assim com a utilização dessa técnica podem ser criados bancos de sementes, sendo ainda uma alternativa promissora para outras abordagens de conservação, como a vitrificação e encapsulamento-desidratação (Seaton et al., 2010; Merritt et al., 2014; Popova et al., 2016).

A utilização de temperaturas criogênicas para o armazenamento de sementes a longo prazo em um banco de sementes, consiste no armazenamento de material vegetal em nitrogênio na fase líquida a uma temperatura de -196 °C, ou na fase de vapor à cerca de -150 °C por longos períodos e com baixo risco de variação genética ou fisiológica (Reed, 2008; Vendrame e Khoddamzadeh, 2017).

A solução vitrificante (PVS2) têm sido uma das soluções crioprotetoras mais usadas (Sakai et al., 1990). No entanto, a eficiência e a recuperação do material vegetal após a criopreservação podem ser baixas devido ao estresse oxidativo e à toxicidade de certos componentes em solução vitrificante. Para contornar essa situação, o uso do floroglucinol (PG) tem sido bem-sucedido na criopreservação de alguns híbridos e espécies de orquídeas (Galdiano Júnior et al., 2012; 2013; Vendrame e Faria, 2011).

O floroglucinol é um 1,3,5-trihidroxibenzeno (derivado do trinitrobenzeno) que ocorre naturalmente em compostos fenólicos de plantas. Os compostos bioativos de ocorrência natural podem ser isolados de fontes como plantas, algas (família Phaeophyceae e Fungaceae) e microrganismos (Silva et al., 2013). O floroglucinol é conhecido por proteger as células contra o estresse oxidativo, inflamação e danos causados pelos radicais livres (Kang et al., 2006; Kim e Kim, 2010).

A criopreservação de sementes de orquídeas dos gêneros *Encyclia* e *Epidendrum* foi estudada anteriormente para as espécies *Encyclia pygmea* e *Encyclia odorantissima* (Alvarez-Pardo e Ferreira, 2006); *Epidendrum quitensium* e *Epidendrum anderssonii* (Cerna et al., 2018); *Encyclia tampensis*, *Epidendrum amphytomum*, *Epidendrum nocturnum* e *Epidendrum rigidum* (Hughes e Kane, 2018).

O objetivo do presente estudo foi avaliar a eficiência da solução vitrificante (PVS2) combinada ao floroglucinol 1% em nitrogênio líquido para a criopreservação de sementes maduras das espécies *Encyclia cordigera* e *Epidendrum ciliare*.

### 3.2 Material e Métodos

Sementes maduras de *Encyclia cordigera* e *Epidendrum ciliare*, foram coletadas de cápsulas na fase deiscente, sendo uma para cada espécie, que foram obtidas através de polinização artificial de plantas cultivadas em estufa no Tropical Research and Education Center (TREC), University of Florida, em Homestead, FL, EUA.

Foi medido o tamanho das sementes através da menção do comprimento (mm) x largura (mm) de 50 sementes para cada espécie, em microscópio eletrônico, com auxílio do software Spot Basic e armazenadas em pequenos envelopes de papel, dentro de pote plástico, em geladeira à temperatura de  $10 \pm 2$  °C, por três e 15 meses, respectivamente, antes de passar pelos procedimentos de criopreservação, que foram realizados no laboratório de Horticultura e Biotecnologia de Plantas Ornamentais do TREC.

Antes da instalação do experimento foi determinado o teor de água das sementes, realizada a partir de uma repetição para *Encyclia cordigera* e duas repetições para *Epidendrum ciliare*, de 0,002 g cada, utilizando o método da estufa a

105 °C  $\pm$  3 °C por 24 horas, segundo as Regras para Análise de Sementes - RAS (Brasil, 2009).

A viabilidade inicial foi avaliada pelo teste de tetrazólio (cloreto de 2,3,5-trifenol tetrazólio) (Hosomi et al., 2012). As sementes foram contadas usando o estereoscópio Leica MZ 12.5 (Leica Microsystems, Buffalo, NY, EUA). As sementes que apresentaram coloração vermelho-rosada foram consideradas viáveis pelo teste de tetrazólio e, para viabilizá-lo, foram realizados testes de germinação em placas de Petri contendo 25 ml de meio de cultivo. O meio utilizado foi ½ MS semissólido, com metade da concentração de nutriente do meio MS (Murashige e Skoog, 1962), suplementado com 15 g L<sup>-1</sup> de sacarose, solidificado com 7 g L<sup>-1</sup> de ágar e pH ajustado a 5,7 antes da autoclavagem a 121 °C à 1 atm. As placas de Petri contendo sementes foram mantidas a 27  $\pm$  2 °C; sob 60  $\mu$ mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, e fotoperíodo de 18-horas, fornecido por duas lâmpadas fluorescente 9A da Philips®.

Foram utilizadas 0,038 g de sementes, para cada espécie, que foram subdivididas em porções iguais e colocadas em fracos de 2 ml (criotubos), seguidos pela adição de 1 ml de solução crioprotetora, composta por 2,0 M de glicerol e 0,4 M de sacarose. Criotubos contendo as sementes e a solução crioprotetora foram mantidos à temperatura ambiente (27  $\pm$  2 °C) por 30 min.

Após esse período foi realizada a remoção da solução concentrada de glicerol e sacarose dos criotubos e adicionado 1 ml de solução vitrificante (PVS2), com ou sem 1% de floroglucinol por 60, 120 e 180 min a 0 °C (pré congelamento, através de imersão parcial dos criotubos em gelo), antes da imersão em nitrogênio líquido. A solução PVS2 é composta por 30% (v/v) de glicerol, 15% (v/v) etileno glicol, e 15% (v/v) de dimetilsulfóxido (DMSO) em meio MS com ½ da concentração de seus nutrientes contendo 0,4 M sacarose, com pH ajustado a 5,7 (Sakai et al., 1990).

Foram incluídos dois tratamentos controle, o primeiro consistindo em germinação *in vitro* e, o segundo por imersão das sementes em nitrogênio líquido sem crioprotetores. Os tratamentos foram: T1 – controle 1: germinação *in vitro* direta, sem nitrogênio líquido; T2 – controle 2: imersão direta em nitrogênio líquido, sem crioprotetores; T3 – PVS2 por 60 min; T4 – PVS2 por 120 min; T5 – PVS2 por 180 min; T6 – PVS2 + floroglucinol 1% por 60 min; T7 – PVS2 + floroglucinol 1% por 120 min; T8 – PVS2 + floroglucinol 1% por 180 min.

Os criotubos foram mantidos em nitrogênio líquido por 72 horas, seguido por descongelamento rápido em banho-maria a 40 °C por 1,5 min. A solução crioprotetora (PVS2) foi removida dos criotubos e foi adicionado 1 ml de sacarose de 1,2 M. Após 20 min, a solução de sacarose foi removida e as sementes foram lavadas duas vezes com água destilada autoclavada. O material foi então levado para manipulação em câmara de fluxo laminar, onde foi realizado processo de desinfestação com etanol a 70% (1 min), seguido de hipoclorito de sódio a 0,8% (5 min) e finalizado com a tríplice lavagem com água destilada autoclavada (1 min cada).

Após a recuperação do nitrogênio líquido e desinfestação das sementes, três criotubos por tratamento foram submetidos ao teste de viabilidade de sementes, e cinco criotubos por tratamento, foram colocadas para germinar *in vitro* em meio de cultivo ½ MS em placas de Petri, com uma média de 120 sementes por parcela. Todo experimento foi duplicado.

A viabilidade das sementes foi contabilizada após a recuperação das sementes do nitrogênio líquido. A porcentagem de germinação e o desenvolvimento dos protocormos foram avaliados 45 dias após a sementeira. A viabilidade das sementes foi obtida por meio do teste tetrazólio, conforme descrito anteriormente. Para germinação de sementes, foram avaliadas cinco placas de Petri por tratamento, utilizando um estereoscópio Leica MZ 12.5 (Leica Microsystems, Buffalo, NY, EUA).

O desenvolvimento dos protocormos foi avaliado conforme metodologia adaptada de Suzuki et al. (2009), considerando as seguintes classes morfológicas: estágio P1: protocormos inchados clorofilados; estágio P2: protocormos exibindo primeira folha; estágio P3: protocormos com duas ou três folhas.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Foram oito tratamentos e três repetições para a variável viabilidade e oito tratamentos e cinco repetições para germinação e desenvolvimento dos protocormos. Os dados foram submetidos à análise de variância e aqueles com valor percentual foram transformados usando arco-seno  $(x/100)^{1/2}$ . As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). As análises foram realizadas no programa estatístico AgroEstat (Barbosa e Maldonado Júnior, 2015).

### 3.3 Resultados

O tamanho das sementes, medido pelo comprimento (mm) x largura (mm) apresentou média de 0,43 x 0,11 mm e 0,42 x 0,10 mm para *Encyclia cordigera* e *Epidendrum ciliare*, respectivamente (Tabela 1), sendo a forma e o tamanho das sementes semelhantes entre as duas espécies (Figura 1).

Tabela 1. Biometria, tempo de armazenamento e teor de água (%) das sementes de *Encyclia cordigera* e *Epidendrum ciliare*.

| Características das sementes               | <i>Encyclia cordigera</i> | <i>Epidendrum ciliare</i> |
|--------------------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Comprimento das sementes (mm) <sup>a</sup> | 0,43 ± 0,066              | 0,42 ± 0,023              |
| Largura das sementes (mm) <sup>a</sup>     | 0,11 ± 0,002              | 0,10 ± 0,071              |
| Tempo de armazenamento (meses)             | 03                        | 15                        |
| Teor de água (%)                           | 8,0                       | 20,0                      |

<sup>a</sup> Média de 50 sementes ± desvio padrão.

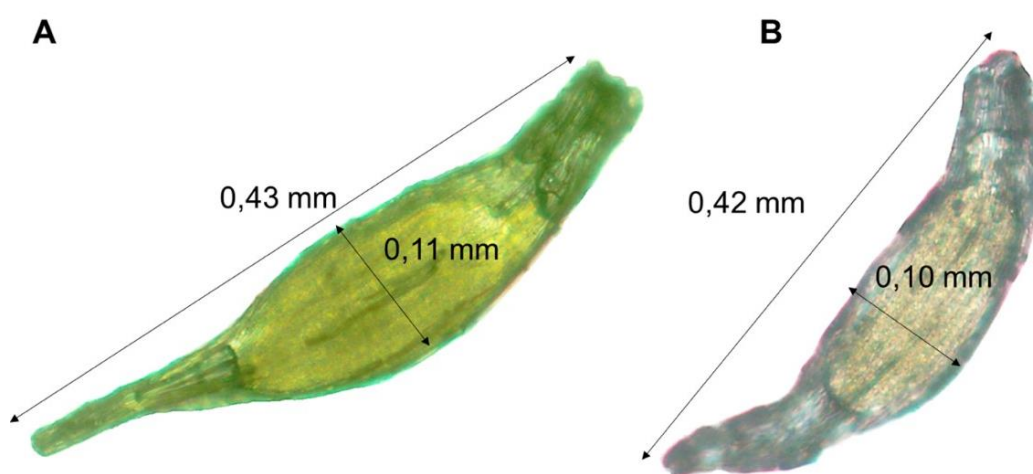


Figura 1. Sementes de *Encyclia cordigera* (A) e *Epidendrum ciliare* (B), menção do comprimento (mm) e largura (mm).

No tratamento controle 1 (T1), sementes de *Encyclia cordigera* apresentaram viabilidade inicial de 91,03% e germinação de 91,99%. Para *Epidendrum ciliare*, a viabilidade das sementes foi de 85,65% e a germinação 85,90% (Tabela 2). No controle 2 (T2), no qual as sementes foram imersas diretamente no nitrogênio líquido, sem PVS2 e sem floroglucinol, as sementes de *Encyclia cordigera* mostraram

porcentagem de viabilidade 26,56% e germinação de 30,59%, enquanto, para *Epidendrum ciliare*, as sementes não mantiveram a viabilidade e não ocorreu germinação.

Após a recuperação da criopreservação, as sementes de *Encyclia cordigera* apresentaram valores de porcentagem de viabilidade acima de 81,53% para todos os tratamentos com crioproteção, apresentando médias que não diferiram significativamente do controle 1 (T1), exceto para o tratamento 8 (T8).

Tabela 2. Viabilidade de sementes (%) e germinação (%) de *Encyclia cordigera* e *Epidendrum ciliare* após recuperação da criopreservação em nitrogênio líquido sob diferentes tratamentos.

| Tratamentos <sup>c</sup> | <i>Encyclia cordigera</i> |                        | <i>Epidendrum ciliare</i> |                        |
|--------------------------|---------------------------|------------------------|---------------------------|------------------------|
|                          | Viabilidade <sup>a</sup>  | Geminação <sup>b</sup> | Viabilidade <sup>a</sup>  | Geminação <sup>b</sup> |
|                          | -----%-----               | -----%-----            | -----%-----               | -----%-----            |
| T1                       | 91,03 ab                  | 91,99 a                | 85,65 a                   | 85,90 a                |
| T2                       | 26,56 c                   | 30,59 c                | 0,00 f                    | 0,00 g                 |
| T3                       | 89,83 ab                  | 90,96 a                | 24,87 c                   | 25,50 cd               |
| T4                       | 89,02 ab                  | 88,24 ab               | 14,22 d                   | 14,29 e                |
| T5                       | 91,00 ab                  | 91,57 a                | 5,38 e                    | 5,83 f                 |
| T6                       | 93,76 a                   | 91,02 a                | 22,69 cd                  | 22,64 d                |
| T7                       | 87,36 ab                  | 88,43 ab               | 28,03 c                   | 27,05 bc               |
| T8                       | 81,53 b                   | 77,99 b                | 39,23 b                   | 37,88 b                |
| CV%                      | 5,39                      | 5,98                   | 7,93                      | 9,46                   |

<sup>a</sup> Valores são as médias de 3 repetições com 300 sementes por tratamento. <sup>b</sup> Valores são as médias de 5 repetições com 600 sementes por tratamento. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). <sup>c</sup> T1 = controle 1: teste de germinação direto, sem PVS2, sem floriglucinol (PG), sem NL; T2 = controle 2: sem PVS2, sem (PG), imersão direta em NL; T3 – PVS2 por 60 min; T4 – PVS2 por 120 min; T5 – PVS2 por 180 min; T6 – PVS2 + PG 1% por 60 min; T7 – PVS2 + PG 1% por 120 min; T8 – PVS2 + PG 1% por 180 min. CV – coeficiente de variação.

Para *Epidendrum ciliare* as porcentagens de viabilidade e de germinação foram significativamente menores que o controle 1 (T1) em todos os demais tratamentos, T3, T4, T5, T6, T7 e T8, sendo que os melhores resultados foram observados no tratamento com solução de PVS2 + PG 1% por 180 min (T8) com viabilidade de 39,23% e germinação de 37,88%.

Os protocormos de ambas espécies apresentaram desenvolvimento morfológico sem anormalidades (Figura 2A e B). O primeiro estágio de

desenvolvimento P1 foi caracterizado por um protocormo dilatado e clorofilado, seguido de P2 com protocormos mostrando uma folha e P3 com protocormo apresentando duas ou mais folhas (Figura 2A e B). O desenvolvimento dos protocormos foi semelhante para *Encyclia cordigera* e *Epidendrum ciliare* (Suzuki et al., 2009).

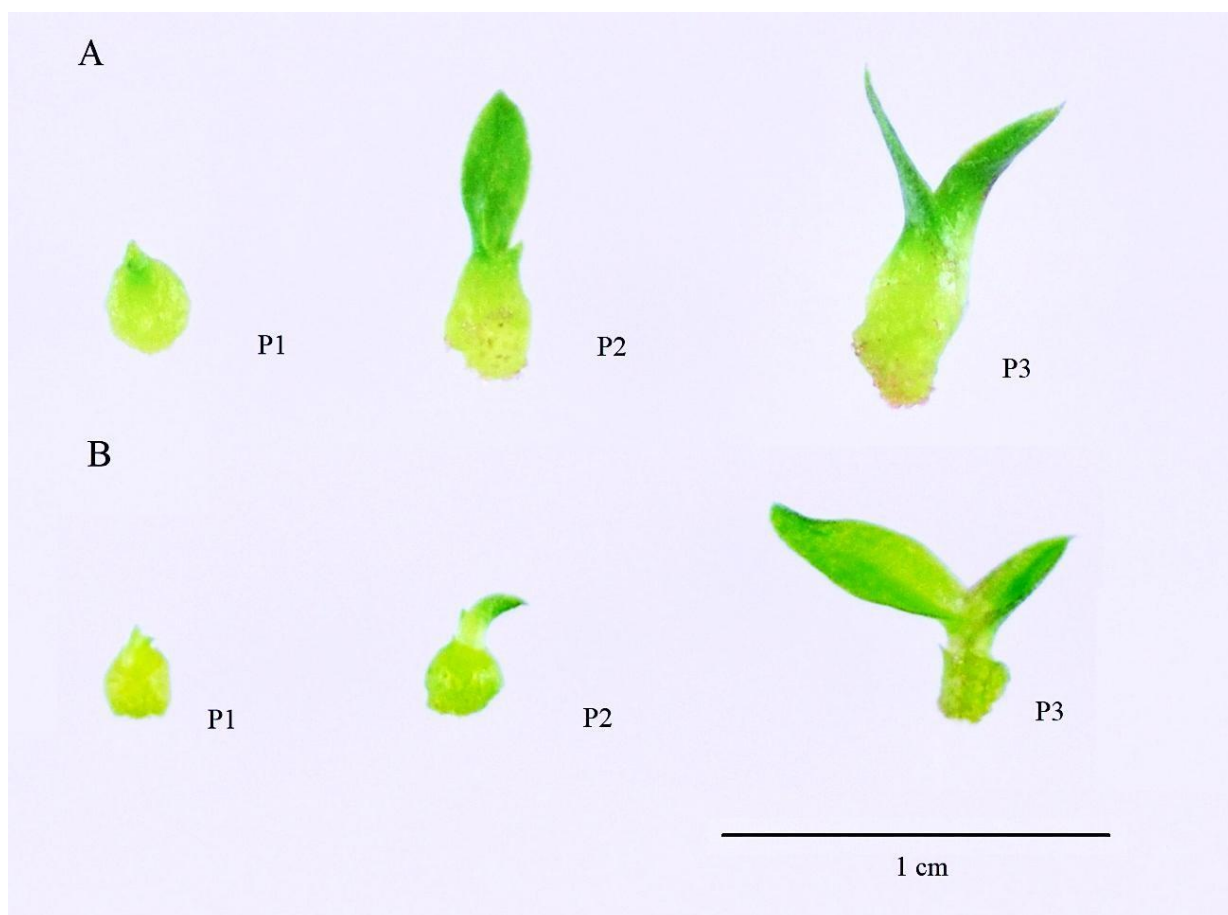


Figura 2. Protocormos de *Encyclia cordigera* (A) e *Epidendrum ciliare* (B) imagem das diferentes classes morfológicas e estádios de desenvolvimento: P1 – protocormo clorofilado, inchado e dilatado, P2 – protocormo exibindo uma folha, e P3 – protocormo exibindo duas ou mais folhas (Suzuki et al., 2009).

No entanto, o desenvolvimento de protocormos 45 dias após a criopreservação mostrou variação para as duas espécies em todos os tratamentos (Tabela 3). Para *Encyclia cordigera*, foi observado desenvolvimento dos protocormos até o estágio P3 no controle 1 (T1) e nos tratamentos com PVS2 por 60 min (T3) e PVS2 + PG 1% por 60 min (T6) , sendo a maior média atingida no controle 1 (15,2%) e a segunda maior

no T6 (9,8%). Não foram observados protocormos em estágio P3 nos demais tratamentos.

Tabela 3. Porcentagem de protocormos em estágio de desenvolvimento: P1, P2 e P3 de *Encyclia cordigera* e *Epidendrum ciliare* após recuperação da criopreservação em nitrogênio líquido por 72 horas, sob diferentes tratamentos.

| Trat. <sup>b</sup> | <i>Encyclia cordigera</i> <sup>a</sup> |                |               | <i>Epidendrum ciliare</i> <sup>a</sup> |                |               |
|--------------------|----------------------------------------|----------------|---------------|----------------------------------------|----------------|---------------|
|                    | P1                                     | P2             | P3            | P1                                     | P2             | P3            |
|                    | ----- % -----                          | ----- % -----  | ----- % ----- | ----- % -----                          | ----- % -----  | ----- % ----- |
| T1                 | 15,1 ± 1,00 d                          | 69,7 ± 1,15 a  | 15,2 ± 0,81a  | 2,09 ± 0,89 cd                         | 22,5 ± 1,47 cd | 75,4 ± 1,62 a |
| T2                 | 43,9 ± 1,73 c                          | 56,1 ± 1,73 b  | 0,00 d        | 0,00 d                                 | 0,00 e         | 0,00 d        |
| T3                 | 23,6 ± 1,91 d                          | 71,5 ± 1,49 a  | 4,9 ± 1,24 c  | 60,5 ± 3,71a                           | 39,5 ± 3,71 b  | 0,00 d        |
| T4                 | 57,4 ± 1,98 b                          | 42,6 ± 1,98 c  | 0,00 d        | 18,9 ± 0,88 b                          | 81,1 ± 0,88 a  | 0,00 d        |
| T5                 | 50,5 ± 1,22 bc                         | 49,5 ± 1,22 bc | 0,00 d        | 56,8 ± 3,53 a                          | 43,2 ± 3,53 b  | 0,00 d        |
| T6                 | 42,7 ± 1,56 c                          | 47,5 ± 1,39 bc | 9,8 ± 1,09 b  | 15,4 ± 1,07 b                          | 42,6 ± 0,66 b  | 42,0 ± 0,30 c |
| T7                 | 41,9 ± 1,42 c                          | 58,1 ± 1,42 b  | 0,00 d        | 3,6 ± 1,01 c                           | 37,0 ± 2,37 bc | 59,5 ± 2,45 b |
| T8                 | 72,8 ± 2,27 c                          | 27,2 ± 1,27 d  | 0,00 d        | 3,7 ± 1,80 c                           | 17,5 ± 1,10 d  | 78,9 ± 1,23 a |
| CV%                | 8,42                                   | 7,08           | 22,13         | 20,41                                  | 13,87          | 9,46          |

<sup>a</sup> Valores são as médias de 5 repetições com 600 sementes por tratamento ± desvio padrão. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). <sup>b</sup> Tratamentos: T1 = controle 1: teste de germinação direto, sem PVS2, sem floroglucinol (PG), sem NL; T2 = controle 2: sem PVS2, sem (PG), imersão direta em NL; T3 – PVS2 por 60 min; T4 – PVS2 por 120 min; T5 – PVS2 por 180 min; T6 – PVS2 + PG 1% por 60 min; T7 – PVS2 + PG 1% por 120 min; T8 – PVS2 + PG 1% por 180 min. CV – coeficiente de variação.

Para *Epidendrum ciliare*, os protocormos atingiram estágio P3 em todos os tratamentos com adição de floroglucinol 1%. Foi observado que, quando aumentado o tempo de exposição das sementes à solução crioprotetora, PVS2 + floroglucinol 1%, maiores porcentagens de protocormos com duas ou mais folhas (P3) se desenvolveram, sendo o tempo de exposição e as médias de P3 de: 60 min com 42,0% (T6), 120 min com 59,5% (T7), e 180 min com 78,9% (T8). A média de 78,9% dos protocormos em estágio P3 observada no T8 não diferiu significativamente do tratamento 1.

### 3.4 Discussão

A avaliação da viabilidade percentual de sementes através do teste de tetrazólio, como se relaciona à porcentagem de germinação é de grande relevância

para a avaliação adequada do sucesso nos protocolos de criopreservação. Neste estudo, o teste de tetrazólio mostrou relação estreita com o teste de germinação (Tabela 2).

A viabilidade inicial das sementes também é afetada pelo período de armazenamento das sementes e depende de suas características intrínsecas, associadas aos componentes bióticos e abióticos do ambiente (Merritt et al., 2014). Neste estudo, o armazenamento de curto prazo para sementes de *Encyclia cordigera* (três meses) resultou em maior viabilidade e germinação do que no armazenamento de longo prazo para as sementes de *Epidendrum ciliare* (15 meses).

No entanto, a viabilidade e germinação reduzidas das sementes de *Encyclia cordigera* ao utilizar o PVS2 + PG 1% por 180 min (T8) podem ser indicativos de toxicidade devido à maior exposição das sementes (180 min) à solução crioprotetora. Soluções crioprotetoras, como PVS2, podem ser tóxicas e causar estresse osmótico, levando à morte celular ou alterações morfológicas nas plântulas (Sakai, 1995). Embora os valores percentuais de viabilidade e germinação tenham sido menores para T8 (PVS2 + PG 1% 180 min), estes ainda foram elevados, pois, tanto a viabilidade quanto a germinação após a imersão em nitrogênio líquido representaram 81,53% e 77,99% da viabilidade e germinação inicial, respectivamente.

No presente estudo, as sementes de *Epidendrum ciliare* apresentaram viabilidade (39,23%) e germinação (37,88%), sob PVS2 + PG 1% por 180 min (T8) antes da imersão em nitrogênio líquido. Os melhores valores em T8 representam 45,8% e 44,1% da viabilidade e germinação, respectivamente, em relação ao controle 1 (T1). Resultados similares foram observados para sementes híbridas de *Dendrobium*, com germinação de 58% quando exposta ao PVS2 por 180 min, com teor de água das sementes de 12% (Galdiano Júnior et al., 2014) bem como para *Vanda coerulea*, que atingiram 67% de germinação quando submetidas ao PVS2 por 70 min, com teor de água das sementes de 33% (Thammasiri e Soamkul, 2007). Os resultados observados para as sementes de *Epidendrum ciliare*, com teor de água de 20%, submetidas a criopreservação reforçam que o efeito da desidratação que a solução vitrificante PVS2 por período de 180 min propicia é adequada.

O sucesso dos processos de criopreservação envolve o controle rigoroso no processo de desidratação, permeabilidade da solução crioprotetora e prevenção de

lesões causadas por estresse osmótico e toxicidade dos componentes químicos das soluções durante a desidratação (Vendrame et al., 2014; Vendrame, 2018). Sabe-se que a vitrificação fornece uma transição adequada da água intracelular para um estado de vidro amorfo que impede a cristalização do gelo e consequentemente danos às células (Kulus e Zalewska, 2014).

A imersão direta das sementes de *Encyclia cordigera* em nitrogênio líquido resultou em 26,56% de viabilidade e 30,59% de germinação sob controle 2 (T2). Embora os valores de viabilidade e porcentagem de germinação, na criopreservação das sementes sem crioproteção (T2), tenham sido significativamente menores que os tratamentos com crioproteção, esse resultado pode ser considerado satisfatório, pois segundo Arditti e Ghani (2000) uma única cápsula de orquídea pode conter mais de 4 milhões de sementes.

Resultados similares foram relatados para sementes de *Angraecum magdalenae*, que apresentaram 40% de germinação após imersão direta em nitrogênio líquido, comparadas com 92% de germinação quando pré-tratadas com PVS2 por 30 min antes da criopreservação (Schofield et al., 2018). A especificidade das espécies também foi observada nos resultados de outros estudos em sementes criopreservadas de nove espécies nativas da Flórida, que se recuperaram e germinaram com sucesso após a imersão direta em nitrogênio líquido sem exposição a crioprotetores (Hughes e Kane, 2018).

Por outro lado, quando as sementes de *Epidendrum ciliare* foram imersas diretamente em nitrogênio líquido sem crioproteção (T2), as médias da porcentagem de viabilidade e de germinação foram nulas, mostrando que o uso de solução vitrificante para esta espécie é essencial. Esse resultado pode ser atribuído ao teor de água das sementes de *Epidendrum ciliare*. A letalidade de sementes imersas em nitrogênio líquido sem crioproteção também foi observada em *Vanda coerulea*, com teor de água de 33% (Thammasiri e Soamkul, 2007).

No presente estudo, o floroglucinol proporcionou viabilidade e germinação significativamente mais altas quando combinado com PVS2. O uso de floroglucinol em protocolos de criopreservação tem sido relatado para melhorar a recuperação, germinação e sobrevivência em várias espécies de orquídeas e híbridos, como protocormos de *Dendrobium nobile* (Vendrame e Faria, 2011), sementes e

protocormos de *Dendrobium hybrid* (Galdiano Júnior et al., 2012), sementes de *Oncidium flexuosum* (Galdiano Júnior et al., 2013), sementes de *Cattleya walkeriana* (Galdiano Júnior et al., 2017) e sementes de *Catasetum atratum* (Suzuki et al., 2018). O floriglucinol também possui propriedade antioxidante, que pode ter contribuído para reduzir o estresse oxidativo nas células das sementes em germinação (Benson e Bremmer, 2004).

Os protocormos de *Encyclia cordigera* passaram pelos 3 estádios de desenvolvimento, sob o controle 1 (T1), T3 e T6, sendo a diferença entre T3 e T6 a adição de 1% de floriglucinol, à solução de PVS2 (Tabela 3). Esses resultados mostram novamente o efeito positivo do floriglucinol em melhorar não apenas a germinação após a recuperação do nitrogênio líquido, mas também o desenvolvimento subsequente de protocormos com folhas.

Tais benefícios foram relatados anteriormente por Vendrame e Faria (2011) que mostraram melhora significativa no desenvolvimento de protocormos de *Dendrobium nobile* quando 1% de floriglucinol foi adicionado ao PVS2. Da mesma forma, Suzuki et al. (2018), mostraram que a adição de 1% de floriglucinol à solução de PVS2 e exposição das sementes por 10 min antes da criopreservação promoveu a germinação e desenvolvimento de protocormos da espécie *Catasetum atratum*.

Para a espécie *Epidendrum ciliare* observou-se o desenvolvimento de protocormos 45 dias após a semeadura em estágio P3 para todos os tratamentos em que foi acrescido o floriglucinol 1% a solução de PVS2 independentemente do tempo de exposição. Foi observada maior porcentagem de protocormos com folhas (42 a 79%) para *Epidendrum ciliare* em comparação com *Encyclia cordigera* (4,9 a 9,8%).

O efeito do floriglucinol adicionado ao PVS2 para a criopreservação de sementes foi mais evidente para *Epidendrum ciliare* do que para *Encyclia cordigera*, pois para *Epidendrum ciliare* apenas os tratamentos com floriglucinol 1% resultaram em desenvolvimento de protocormos até o estágio P3.

Portanto, o uso de floriglucinol foi essencial para a manutenção da viabilidade das sementes e para o desenvolvimento de protocormos normais. Esses resultados confirmam os benefícios que o floriglucinol pode conferir às sementes e tecidos de plantas, bem como proteger as células ao estresse oxidativo, inflamação e danos pelos causados pelos radicais livres (Kim e Kim, 2010). Também confirma que os

resultados podem ter respostas específicos para cada espécie, conforme indicado por Hughes e Kane (2018).

O processo de vitrificação com os crioprotetores foi essencial para a criopreservação bem-sucedida de sementes das duas espécies em questão. A avaliação de diferentes tempos de exposição ao PVS2 e a adição do floroglucinol ao PVS2 forneceram os elementos para a determinação de um protocolo de criopreservação para ambas as espécies de orquídeas.

### 3.5 Conclusão

A utilização da solução vitrificante (PVS2) combinado ao floroglucinol 1% foi eficiente na recuperação de sementes criopreservadas em nitrogênio líquido, elevou a porcentagem de germinação e desenvolvimento dos protocormos para as duas espécies em estudo. Os resultados observados indicam o uso de PVS2 combinado com floroglucinol 1% por 60 min para a criopreservação de sementes de *Encyclia cordigera*, e PVS2 com floroglucinol 1% por 180 min para sementes de *Epidendrum ciliare*. O presente estudo também indica que a resposta à criopreservação após o armazenamento à frio é específica da espécie e requer ajustes no tempo de exposição ao PVS2 a 0 °C antes da imersão em nitrogênio líquido.

### 3.6 Referências

Alvarez-Pardo V, Ferreira AG (2006) Armazenamento de sementes de orquídeas. **Revista Brasileira de Sementes** 28:92-98.

Arditti J, Ghani AKA (2000) Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. **New Phytologist, Lancaster** 145:367-421.

Barbosa JC, Maldonado Júnior JRW (2015) **AgroEstat: sistema para análises estatísticas de ensaios agrônômicos**. Versão 1.1.0.711. Jaboticabal: Funep, 396 p.

Benson EE, Bremmer D (2004) Oxidative stress in the frozen plant: a free radical point of view. In: Fuller, B.J.; N. Lane; and E.E. Benson (eds.). **Life in the Frozen State**. Boca Raton: CRC Press, p. 205-24.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2009) **Regras para análise de sementes**. Brasília: MAPA, 399p.

Cerna M, Valdivieso P, Cella R, Mátyás B, Aucapiña C (2018) Cryopreservation of orchid seeds through rapid and step freezing methods. **F1000Research** 7:209.

Galdiano Júnior RF, Lemos EGM, Faria RT, Vendrame WA (2012) Cryopreservation of *Dendrobium* hybrid seeds and protocorms as affected by phloroglucinol and Supercool X1000. **Scientia Horticulturae** 148: 154-160.

Galdiano Júnior RF, Lemos EGM, Vendrame WA (2013) Cryopreservation, early seedling development, and genetic stability of *Oncidium flexuosum* Sims. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 114:139-148.

Galdiano Júnior RF, Lemos EGM, Vendrame WA (2014) Seedling development and evaluation of genetic stability of cryopreserved *Dendrobium* hybrid mature seeds. **Applied Biochemistry and Biotechnology** 172:2521-2529.

Galdiano Júnior RF, Vendrame WA, Moretto C, Faria RT, Lemos EGM (2017) Seed cryopreservation, *in vitro* propagation and *ex vitro* growth of *Cattleya walkeriana* Gardner, a vulnerable ornamental orchid. **Australian Journal Crop Science** 11:485-490.

Hosomi ST, Custódio CC, Seaton PT, Marks TR, Machado-Neto NB (2012) Improved assessment of viability and germination of *Cattleya* (Orchidaceae) seeds following storage. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant** 48:127-136.

Hughes BA, Kane, ME (2018) Seed cryopreservation of selected Florida native orchid species. **Seed Science and Technology** 46:431-446.

Kang KA, Lee KH, Chae S, Zhang R, Jung MS, Ham YM, Baik JS, Lee NH, Hyun, JW (2006) Cytoprotective effect of phloroglucinol on oxidative stress induced cell damage via catalase activation. **Journal of cellular biochemistry** 97:609-620.

Kim MM, Kim SK (2010) Effect of phloroglucinol on oxidative stress and inflammation. **Food and Chemical Toxicology** 48:2925-2933.

Kulus D, Zalewska M (2014) Cryopreservation as a tool used in long-term storage of ornamental species—a review. **Scientia Horticulturae** 168:88-107.

Lavarack B, Harris W et al. (2002) **Botanica's Orchid**. San Diego: Laurel Glen Publishing, 568p.

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, 2014.

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum** 15:473-497.

Popova E, Kim HH, Saxena PK, Engelmann F, Pritchard HW (2016) Frozen beauty: The cryobiotechnology of orchid diversity. **Biotechnology advances** 34:380-403.

Reed BM (2008) **Plant cryopreservation: a practical guide**. New York: Springer, 513p.

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

Sakai A, Kobayashi S, Oiyama I (1990) Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. **Plant Cell Reports** 9:30-33.

Schofield E, Jones EP, Sarasan V (2018) Cryopreservation without vitrification suitable for large scale cryopreservation of orchid seeds. **Botanical Studies** 59:13.

Seaton PT, Hu H, Perner H, Pritchard HW (2010). *Ex situ* conservation of orchids in a warming world. **The botanical review** 76:193-203.

Silva JAT, Dobránszki J, Ross S (2013) Phloroglucinol in plant tissue culture **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant** 49:1-16.

Suzuki ABP, Vidal TCM, Alves GAC, Junior DB, Biz G, Sorace M, Faria RT (2018) Cryopreservation of Brazilian orchid (*Catasetum atratum* Lindl.) seed at risk of extinction. **Australian Journal of Crop Science** 12:1051.

Suzuki RM, Moreira VC, Nakabashi M, Ferreira WDM (2009) *In vitro* germination and growth of *Hadrolaelia tenebrosa* (Rolfe) Chiron & VP Castro (Orchidaceae), an endangered species of the Brazilian flora. **Hoehnea** 36:657-666.

Swarts ND, Dixon KW (2009) Terrestrial orchid conservation in the age of extinction. **Annals of Botany** 104:543-556.

Thammasiri K, Soamkul I (2007) Cryopreservation of *Vanda coerulea* Griff. Ex Lindl. Seeds by vitrification. *Sci Asia* 33:223-227.

Vendrame WA (2018) Cryopreservation. In: Lee YI, Yeung ET (eds.). **Orchid Propagation: From Laboratories to Greenhouses-Methods and Protocols**. Springer Protocols Handbooks. New York: Humana Press, p. 282-302.

Vendrame WA, Faria RT (2011) Phloroglucinol enhances recovery and survival of cryopreserved *Dendrobium nobile* protocorms. **Scientia Horticulturae** 12:131-135.

Vendrame WA, Faria RT, Sorace M, Sahyun SA (2014) Orchid cryopreservation. **Ciência e Agrotecnologia** 38:213-229.

Vendrame WA, Khoddamzadeh AA (2017) Orchid biotechnology. **Horticultural Reviews** 44:173-228.

Zotz G (2013) The systematic distribution of vascular epiphytes a critical update. **Botanical Journal of the Linnean Society** 171:453-481.