



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DOUTORADO EM AGRONOMIA

MILENA CRISTINA MORAES

CONSERVAÇÃO DE SEMENTES DE *Catasetum* (Orchidaceae): GERMINAÇÃO
E PERFIS LIPÍDICOS

Presidente Prudente - SP
2022



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DOUTORADO EM AGRONOMIA**

MILENA CRISTINA MORAES

**CONSERVAÇÃO DE SEMENTES DE *Catasetum* (Orchidaceae): GERMINAÇÃO
E PERFIS LIPÍDICOS**

Tese apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor – Área de concentração: Produção Vegetal.

Orientador:
Prof. Dr. Nelson Barbosa Machado Neto

Presidente Prudente - SP
2022

635.934 4
F481c

Moraes, Milena Cristina.
Conservação de sementes de *Catasetum*
(Orchidaceae): germinação e perfis lipídicos / Milena
Cristina Moraes. – Presidente Prudente, 2023.
92 f.: il.

Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade do
Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP,
2023.

Bibliografia.

Orientador: Nelson Barbosa Machado Neto

1. Orquídea. 2. Teste de tetrazólio. 3.
Cromatografia gasosa. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "CONSERVAÇÃO DE SEMENTES DE *Catasetum* (Orchidaceae):
GERMINAÇÃO E PERFIS LIPÍDICOS"

AUTOR(A): MILENA CRISTINA MORAES

ORIENTADOR(A): Prof. Dr. NELSON BARBOSA MACHADO NETO

Aprovado(a) como parte das exigências para obtenção do título de DOUTORA em
AGRONOMIA

Área de Concentração PRODUÇÃO VEGETAL, pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. Fabiana Lima Abrantes



UNOESTE – Universidade do Oeste Paulista / Presidente Prudente (SP)

Profa. Dra. Monica Rosa Bertão



UNESP – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho / Assis (SP)

Prof. Dr. Nelson Barbosa Machado Neto



UNOESTE – Universidade do Oeste Paulista / Presidente Prudente (SP)

Prof. Dr. Rodrigo Bustos Singer



UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul / Porto Alegre (RS)

Prof. Dr. Ricardo Tadeu de Faria



UEL – Universidade Estadual de Londrina (PR)

Presidente Prudente, 09 de dezembro de 2022.

DEDICATÓRIA

À minha família

AGRADECIMENTOS

Ao Senhor Deus do universo, que me permitiu encontrar as pessoas certas na hora certa e me deu forças quando eu mais precisei.

À minha família, em princípio ao meu marido Juliano que sempre me incentivou e apoiou; aos meus pais Márcia e Jorge que deram suporte em toda minha vida; ao meu irmão Luis pelas consultas estilísticas; à minha madrinha Mônica que me ensinou o caminho da ciência; e à minha avó Maria com suas orações.

Ao meu orientador Nelson Barbosa Machado Neto, por me acolher tão gentilmente, pelos ensinamentos e pela parceria que começamos aqui.

Às professoras Ceci Castilho Custódio e Fabiana Lima Abrantes, pela competência e disposição sempre que necessário.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Unoeste, pelo conhecimento compartilhado.

Aos funcionários e técnicos de laboratório, pelos diversos serviços sem os quais esse trabalho não teria se realizado.

Às colegas Jéssica, Camila, Mariane, Estela, Maria Clara e Carolina, pelas conversas, pela companhia e por toda ajuda durante essa jornada.

Aos orquidários Aurora, Bela Vista, Rio Preto e Valdison Catasetinae e ao Orchid Seed Science/Stores for Sustainable Use (OSSSU), pelos materiais que proporcionaram o desenvolvimento desse trabalho.

Enfim, obrigada por estarem ao meu lado!

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

“Nothing in science can account for the way people feel about orchids”.

(Susan Orlean)

RESUMO

Conservação de sementes de *Catasetum* (Orchidaceae): germinação e perfis lipídicos

Orchidaceae é a maior família de plantas, amplamente diversa e evoluída. Habitam os mais diversos ambientes, porém de maneira desuniforme, com populações mais expressivas nas regiões tropicais. As orquídeas estão entre as espécies mais rentáveis no mercado internacional de plantas. Apesar do uso de técnicas de cultura assimbiótica, a coleta predatória continua ameaçando as populações naturais. As espécies do gênero *Catasetum* Rich. ex Kunth, vem sofrendo intenso extrativismo pelo elevado valor comercial, no entanto a maioria das espécies não possuem avaliação quanto à ameaça. Deste modo, a conservação *ex-situ* visa garantir a preservação da espécie bem como a variabilidade genética, com destaque para o armazenamento de sementes em bancos de germoplasma de longo prazo. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o uso de pré-tratamento para germinação assimbiótica das sementes armazenadas em baixas temperaturas, relacionar a condição de armazenamento para preservação da viabilidade a longo prazo, bem como caracterizar o perfil lipídico de sementes de diferentes espécies de orquídeas do gênero *Catasetum*. Os dados indicam que o pré-tratamento com sacarose 10% por um período de 24 horas em temperatura ambiente, aumenta as taxas de germinação de *Catasetum barbatum*, *Catasetum complanatum* e *Catasetum galeritum*, independente do meio de cultura utilizado. E o melhor tratamento encontrado para manutenção da viabilidade por 20 meses para as sementes de *Catasetum barbatum*, *Catasetum complanatum*, *Catasetum galeritum* e *Catasetum fimbriatum* é o armazenamento das sementes em temperatura de -18 °C. Os perfis lipídicos dos acessos aqui analisados, apresentam variação entre as espécies de *Catasetum*. Os valores mais elevados de índice de peroxidação e índice de ligação dupla em *Catasetum gladiatorium* sugerem que esta espécie está mais suscetível à dano oxidativo, implicando em deterioração durante o armazenamento. Os valores de ácidos graxos insaturados mais elevados que ácidos graxos saturados, levam a crer que a baixa temperatura não é o fator crítico no armazenamento de *Catasetum*, o que pode contribuir para longevidade das sementes.

Palavras-chave: orquídea; meio de cultura; pré-tratamento; teste de tetrazólio; cromatografia gasosa.

ABSTRACT

Conservation of *Catasetum* seeds (Orchidaceae): germination and lipid profiles

Orchidaceae is the largest plant family, widely diverse and evolving. They inhabit the most diverse environments, but unevenly, with more expressive populations in tropical regions. Orchids are among the most profitable species on the international plant market. Despite the use of asymbiotic culture techniques, the predatory collection continues to threaten natural populations. Species of the genus *Catasetum* Rich. ex Kunth, has been suffering intense extraction due to its high commercial value, however, most species do not have a threat assessment. In this way, *ex-situ* conservation aims to guarantee the preservation of the species as well as genetic variability, with emphasis on the storage of seeds in long-term germplasm banks. This study aimed to evaluate the use of pre-treatment for asymbiotic germination of seeds stored at low temperatures, relate the storage condition to preservation of long-term viability, as well as characterize the lipid profile of seeds of different species of orchids from the genus *Catasetum*. The data indicate that pre-treatment with 10% sucrose for a period of 24 hours at room temperature increases the germination rates of *Catasetum barbatum*, *Catasetum complanatum* and *Catasetum galeritum*, regardless of the culture medium used. And the best treatment found to maintain viability for 20 months for the seeds of *Catasetum barbatum*, *Catasetum complanatum*, *Catasetum galeritum* and *Catasetum fimbriatum* is the storage of seeds at a temperature of -18 °C. The lipid profiles of the accessions analyzed here show variation among *Catasetum* species. The highest values of peroxidation index and double bond index in *Catasetum gladiatorium* suggest that this species is more susceptible to oxidative damage, implying deterioration during storage. The higher values of unsaturated fatty acids than saturated fatty acids suggest that low temperature is not the critical factor in *Catasetum* storage, which may contribute to seed longevity.

Keywords: orchid; culture medium; pre-treatment; tetrazolium test; gas chromatography.

LISTA DE SIGLAS

AGI	– Ácido Graxo Insaturado
AGM	– Ácido Graxo Monoinsaturado
AGP	– Ácido Graxo Poli-insaturado
AGS	– Ácido Graxo Saturado
CAM	– Metabolismo Ácido das Crassuláceas
Ctsm	– <i>Catasetum</i>
DCCA	– Sodium Dichloroisocyanurate / Dicloroisocianurato de Sódio
DP	– Desvio Padrão
G	– Germination / Germinação
GSI	– Germination Speed Index
ILD	– Índice de Ligação Dupla
IP	– Índice de Peroxidação
I	– Insaturado
IVG	– Índice de Velocidade de Germinação
LC	– Least Concern / Pouco Preocupante
M	– Monoinsaturado
MM	– Malmgrem Medium / Meio Malmgrem
MS	– Murashige & Skoog
NE	– Not Evaluated / Não Avaliado
P	– Poli-insaturado
S	– Saturado
TZ	– Tetrazólio
VW	– Vacin-Went

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 -	<i>Catasetum</i> species, their place of origin and conservation status.....	39
Tabela 3.2 -	Tetrazolium test (TZ) results and empty testae percentages of <i>Catasetum</i> species. Values expressed as means and standard error.....	41
Tabela 3.3 -	Germination average (%) of <i>Catasetum</i> in MS and MM media, with and without pretreatment and their interactions.....	42
Tabela 3.4 -	Germination (G%) and germination speed index (GSI) of <i>Catasetum</i> species with and without pretreatment in MS and MM media. Values expressed as means and standard error.....	43
Tabela 4.1 -	Médias da viabilidade por teste de tetrazólio para sementes de <i>Catasetum</i> armazenadas em -18 °C e 5 °C no início e após 20 meses de armazenamento.....	55
Tabela 4.2 -	Médias de germinação para sementes de <i>Catasetum</i> armazenadas em -18 °C e 5 °C, no início e após 20 meses de armazenamento.....	56
Tabela 4.3 -	Parâmetros das sementes de <i>Catasetum</i> , σ e P_{50} , armazenadas nas temperaturas -18 °C e 5 °C, para resultados do teste de tetrazólio (TZ) e teste de germinação (G).....	57
Tabela 5.1 -	Espécies de <i>Catasetum</i> , doador, locais de ocorrência e situação de conservação.....	67
Tabela 5.2 -	Composição lipídica (em porcentagem) de espécies de <i>Catasetum</i>	71
Tabela 5.3 -	Relações entre as porcentagens de lipídios em <i>Catasetum</i>	75

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1 O gênero <i>Catasetum</i>	17
2.2 Sementes e suas reservas	20
2.3 Viabilidade e conservação de sementes	22
2.4 Germinação simbiótica	24
2.5 Germinação assimbiótica	24
Referências	26
3 CAPÍTULO I - The influence of pretreatment on germination of three species of <i>Catasetum</i> (Orchidaceae)	37
3.1 Introduction	37
3.2 Material and methods	39
3.2.1 Seed Collection and storage	39
3.2.2 Seed viability	40
3.2.3 Seed germination	40
3.2.4 Experimental design and statistical analysis	41
3.3 Results and Discussion	42
3.4 Conclusion	48
References	48
4 CAPÍTULO II - Influência da temperatura de armazenamento na germinação de sementes de <i>Catasetum</i>	53
4.1 Introdução	55
4.2 Material e Métodos	56
4.2.1 Sementes e armazenamento	56
4.2.2 Viabilidade das sementes.....	56
4.2.3 Teste de germinação.....	57
4.2.4 Probit	57
4.2.5 Análise de dados.....	58
4.3 Resultados	58
4.4 Discussão	62
4.5 Conclusão	64

Referências	64
5 CAPÍTULO III- Reservas lipídicas de sementes de <i>Catasetum</i> (Orchidaceae) 68	68
5.1 Introdução.....	69
5.2 Material e métodos	70
5.2.1 Sementes e armazenamento	70
5.2.2 Determinação de ácidos graxos	72
5.2.3 Análise dos dados	73
5.3 Resultados	73
5.4 Discussão	85
5.5 Conclusão.....	87
Referências	87
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	90

1 INTRODUÇÃO

Basta entrar em qualquer floricultura ou supermercado e lá estão elas. Lindas! As orquídeas fazem parte do cotidiano. Como presente de aniversário, decoração de festas de casamento, lembrança de dia das mães ou simplesmente para alegrar a sala de estar. Independente da data, a presença delas é certa.

As mais variadas formas, cores e fragrâncias, fascinam a todos os amantes da natureza. Com registros de Teofrasto, na Grécia à Confúcio, na China as flores são usadas primordialmente como decoração, apesar de algumas serem comestíveis. Com aparência que lembram bailarinas, outras se parecem com pombas, outras com sapatinhos, até com aranhas, exalam os odores mais diversos, desde os mais desagradáveis, lembrando carne em putrefação, até os florais mais atraentes, ou mesmo alguns semelhantes com canela, uva, mel ou chocolate.

A maioria se abriga nas alturas nos troncos das árvores, no entanto se olhar com cuidado, podem ser encontradas entre rochas ou no meio de alguma pastagem. Já foram encontradas enterradas e vivendo abaixo do solo, apenas florescendo e frutificando acima do solo.

Apesar da facilidade de se adquirir uma orquídea, bela e florida, sua história recente não é tão bonita assim. No século 19, colecionadores aficionados desenvolveram o que foi chamado de “orquidêlrio”, uma espécie de necessidade de acumular e possuir o máximo de espécimes possível de orquídeas dentro de uma estufa particular. Exploradores foram enviados à todas as partes do mundo em busca das orquídeas mais exóticas. Para garantir fama e dinheiro, principalmente em leilões na Europa, os exploradores dizimaram populações nessa corrida maluca que visava garantir as coleções mais diversificada. Nesse período a orquídea representava a supremacia do conhecimento e da cultura.

Charles Darwin também se apaixonou pelas orquídeas; no caso dele, pela polinização. O naturalista descreveu em uma de suas obras toda a anatomia masculina e feminina das flores, bem como os atrativos para insetos realizarem a polinização cruzada. Hoje sabemos que o papel dessas plantas na natureza é muito mais complexo, com suas associações e interações, produção de metabólitos, função ecológica, entre outras.

Muitas histórias rondaram as expedições de coletas de orquídeas e deram origem a obras contando as odisseias dos caçadores de orquídeas. Uma dessas

histórias – *The Orchid Thief*, de Susan Orlean – foi adaptada para o cinema e ganhou um Oscar em 2003.

Esse universo fascinante angaria mais e mais admiradores a cada dia. E os ladrões continuam sua saga em adentrar nas matas e coletar indiscriminadamente o máximo de exemplares possível, reduzindo as populações em seu habitat natural.

Resta a nós, pesquisadores e apaixonados por orquídeas, aumentar o conhecimento sobre tão belas espécies vegetais e conservar o máximo de sua diversidade, com todas as ferramentas que possuímos. E torcer para que um dia, nossas ações tenham resultado e a natureza possa se reestabelecer e permanecer viva, de modo que as futuras gerações que habitarão esse planeta continuem a admirar o encantador mundo das orquídeas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Orchidaceae compreende 750 gêneros contendo mais de 30.000 espécies (GOVAERTS *et al.*, 2022; HASSLER, 2021). É a maior família dentre as plantas monocotiledôneas, amplamente diversa e evoluída (DRESSLER, 1993; GUPTA, 2016). A origem das orquídeas é situada há aproximadamente 110 milhões de anos na Austrália, quando os continentes sul tropicais estavam unidos no supercontinente Gondwana (EKMEKÇIGIL *et al.*, 2019; GIVNISH *et al.*, 2016).

As orquídeas habitam os mais diversos ambientes, porém de maneira desuniforme, com populações mais expressivas nas regiões tropicais, fato que ocorreu no Eoceno, quando expandiram de um clado terrestre para habitar as árvores (CRIBB *et al.*, 2003; FAN *et al.*, 2020; GIVNISH *et al.*, 2016).

A família Orchidaceae pode ser entendida como morfologicamente derivada devido às características que surgiram do início de seu desenvolvimento, tais como estratégias de polinização altamente especializada e relação mutualística com polinizadores, políneas, flores de simetria bilateral, órgãos fundidos, metabólitos secundários especializados e prevalência do metabolismo CAM (metabolismo ácido das crassuláceas) (GIVNISH *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2019; SCHIFF, 2018; TRÁVNÍČEK *et al.*, 2019; UNRUH *et al.*, 2018).

A distribuição global é atribuída à ampla capacidade de dispersão devido às suas diminutas sementes e aos hábitos, podendo ser encontradas em terrenos rochosos, arenosos, alagadiços, sendo cerca de 70% epífitas (GIVNISH *et al.*, 2015; GRAVENDEEL *et al.*, 2004). O Brasil é considerado um dos países mais diversos com relação às orquídeas, detendo 251 gêneros e 2678 espécies, com 55,5% de endemismo (BRASIL, 2022).

As orquídeas estão entre as espécies mais rentáveis no mercado internacional de plantas, ocupando posição de destaque entre todas as flores, com valores acima de US\$ 276 milhões para o comércio legal de flores nos EUA no ano de 2020 (SULTANA *et al.*, 2015; USDA, 2021). O comércio brasileiro movimentou entre exportações e importações de orquídeas, no período de janeiro de 2015 a dezembro de 2021, mais de US\$ 128 milhões (AGROSTAT, 2022).

As demandas de mercado são normalmente supridas pela germinação *in vitro* de sementes, todavia a coleta predatória para fins de coleção e comercialização continua sendo considerada uma grande ameaça (MASTERS *et al.*, 2020). A

crescente exploração e destruição de áreas nativas de orquídeas para o desenvolvimento da agricultura, pastagens e crescimento urbano, também tem colocado em risco a variabilidade genética ou mesmo a existência das populações naturais em todo o mundo (GUPTA, 2016). Com relação à coleta e comércios ilegais das orquídeas raras e espécies puras, pouco se tem conhecimento, aumentando o risco das populações de espécies já ameaçadas ou em risco de extinção (HINSLEY *et al.*, 2017).

O crescimento e desenvolvimento das orquídeas são lentos e afetados pela especificidade climática. O microclima da região que habitam, bem como os extratos vegetativos, influenciam no crescimento e floração das espécies (CALLAWAY *et al.*, 2002; PFEIFER; HEINRICH; JETSCHKE, 2006). Outras questões importantes a se considerar envolvem a complexa biologia reprodutiva das espécies que possuem longo ciclo de vida, a associação com fungos micorrízicos em pelo menos uma fase da vida e a necessidade de polinização cruzada altamente especializada (NIKISHINA *et al.*, 2007).

Neste contexto destacam-se as espécies do gênero *Catasetum* Rich. ex Kunth, que vêm sofrendo intenso extrativismo pelo elevado valor comercial (MAIA; PEDROSO-DE-MORAES, 2017; PEDROSO-DE-MORAES *et al.*, 2007). Das mais de 190 espécies descritas encontradas do México ao sul da América tropical (GOVAERTS *et al.*, 2022), um total de 121 habitam o território brasileiro, sendo que ao menos uma espécie (*Ctasm. mattosianum*¹) está em perigo de extinção e duas são categorizadas como quase ameaçadas (*Ctasm. atratum* e *Ctasm. uncatum*), no entanto a maioria das espécies não foram avaliadas quanto à ameaça (PETINI-BENELLI, 2022).

Distribuídas em todo o território nacional, sendo a região Amazônica a detentora da maior parte de sua diversidade, o gênero *Catasetum* detém dezenas de híbridos naturais (BARBERENA; COSTA; ROCHA JUNIOR, 2020), com novos híbridos e espécies sendo descritos nos últimos anos (BLIND, 2020; FERREIRA, 2019; PETINI-BENELLI; IZZO, 2017).

Dentre as ações para conservação da diversidade, a conservação *in situ* pode estar ameaçada, por conta da degradação dos habitats, uso de pesticidas que tendem a reduzir ou eliminar os polinizadores, alterações físicas da geografia, além

¹ Abreviação de nomes científicos seguem as normas da Royal Horticultural Society para gêneros e híbridos de orquídeas (RHS, 2017).

dos fatores citados anteriormente (CHUGH; GUHA; RAO, 2009). Portanto, lançar mão da conservação *ex-situ* pode ser uma saída de grande valia com a criação de bancos de germoplasma *in vivo* em casas de vegetação, bancos *in vitro*, criobancos ou bancos de sementes.

Para as orquídeas, o banco de germoplasma com uso de sementes visa garantir a variabilidade genética, ou mesmo a preservação da espécie, em pequeno espaço e baixo custo (SEATON; PRITCHARD, 2008). A conservação a longo prazo de sementes de qualquer espécie depende de diversos fatores, como a maturidade da semente, a umidade e a composição do endosperma das mesmas (MIRA *et al.*, 2019; PROBERT *et al.*, 2007).

Das poucas informações sobre os materiais de reserva das sementes de orquídeas, sabe-se que as mesmas não apresentam endosperma com amido, e junto às células do embrião possuem corpos lipídicos como a principal reserva (MANNING; STADEN, 1987). Alguns trabalhos identificaram os lipídios presentes em espécies como *Dactylorhiza fuchsii* e *Grammatophyllum speciosum* (COLVILLE *et al.*, 2015), *Cattleya amethystoglossa*, *C. kautskyana* e *C. tigrina* (FILETI *et al.*, 2021), *Cattleya crispata*, *C. rupestris*, *C. schilleriana*, *C. tenebrosa*, *C. loddigesii*, *C. intermedia* e *C. warner* (HENGLING *et al.*, 2021), *Dendrobium strebloceras*, *Den. cunninghamii*, *Gastrodia cunninghamii*, *Pterostylis banksii* e *Thelymitra nervosa* (DIANTINA *et al.*, 2022). Não obstante, os tipos de lipídios que compõem a reserva das espécies do gênero *Catasetum* são desconhecidos.

O presente trabalho se justifica pela necessidade de conhecer a composição dos materiais de reservas das sementes de orquídeas do gênero *Catasetum*, a fim de aprimorar as técnicas de conservação *ex-situ* por meio da preservação de sementes em banco com temperaturas de 5 °C e -18 °C.

2.1 O gênero *Catasetum*

Pertencente à subfamília Epidendroideae, tribo Cymbidieae, o gênero *Catasetum* Rich. ex Kunth, é o maior gênero pertencente à subtribo Catasetinae (FARIA *et al.*, 2016). Esta subtribo é exclusiva das Américas. O Brasil, compreende 121 espécies, sendo 92 endêmicas, distribuídas na Amazônia (87 espécies),

Cerrado (31 espécies), Mata Atlântica (24 espécies), Caatinga (6 espécies) e Pantanal (2 espécies) (PETINI-BENELLI, 2022).

Desde o ano de 2017 foram descobertas no Brasil as espécies *Ctsm. brasilandense* Benelli (PETINI-BENELLI; IZZO, 2017), *Ctsm. paranaitense* Benelli & Soares-Lopes (PETINI-BENELLI; SOARES-LOPES, 2017), *Ctsm. dalastranum* Benelli & Chiron (PETINI-BENELLI; CHIRON, 2018), *Ctsm. sophiae* Valsko, Krahl & Benelli (VALSKO *et al.*, 2019), *Ctsm. brevilobatum* Marçal & Chiron (CHIRON; MARÇAL, 2019), *Ctsm. lendarium* Blind (BLIND, 2020), *Ctsm. saracataquerense* Krahl, Cantuária & J.B.F.Silva (KRAHL *et al.*, 2021), *Ctsm. marinhoi* Krahl, Cantuária & J.B.F. Silva (KRAHL *et al.*, 2022) e os híbridos naturais *Ctsm. × crassispinum* U.L.C. Ferreira, *Ctsm. × eliasii* U.L.C. Ferreira (FERREIRA, 2019), *Ctsm. × nogueirae* U.L.C.Ferreira, *Ctsm. × santo-antoniense* U.L.C. Ferreira & R.M.C. Filho (FERREIRA; FILHO, 2019), *Ctsm. × aikoae* U.L.C.Ferreira & T.K.Malaspina (CAMPACCI *et al.*, 2019), *Ctsm. × louisiae* D.R.P. Krahl, Krahl & Chiron (KRAHL; KRAHL; CHIRON, 2020), *Catasetum × sheyllae* Krahl, Cantuária & J.B.F.Silva (CANTUÁRIA *et al.*, 2021), e continuamente novas espécies e híbridos de *Catasetum* são descritos, tanto no Brasil, como em outros países da América do Sul e Central.

O uso medicinal das orquídeas é relatado em todo o mundo. Foi relatado o uso de espécies de *Catasetum* na cultura indígena para o tratamento de furúnculos e abscessos. Os maias de Yucatan empregavam *Ctsm. maculatum* no tratamento feridas e tumores e *Ctsm integerrimum* no tratamento de queimaduras e feridas em geral (TEOH, 2019a). No caso da espécie *Ctsm. fimbriatum*, a decocção de pseudobulbos era usada como contraceptivo no Paraguai (TEOH, 2019b).

São na sua maioria epífitas habitando árvores de 10 a 40 metros de altura, mas podem ser terrícolas e rupícolas, com flores monoclinas ou diclinas femininas e masculinas, cuja diferenciação sexual não foi completamente elucidada. Assim, em locais com maior intensidade luminosa as plantas originarão preferencialmente flores femininas e em locais sombreados, as flores serão majoritariamente masculinas (MAIA; PEDROSO-DE-MORAES, 2017; MORALES *et al.*, 2016; ZIMMERMAN, 1991).

A inflorescência é racemosa e se desenvolve próxima à base do pseudobulbo e pode ser pendular, ereta ou arqueada com número variado de botões florais, que após a abertura podem ser observados por até oito dias (BLIND, 2020;

PETINI-BENELLI, 2012). O dimorfismo sexual está relacionado à polinização altamente especializada, que se dá por abelhas macho da tribo Euglossini (*Euglossa*, *Eulaema* e *Eufriesa*) que vão coletar metabólitos aromáticos produzidos pelas flores e secretadas em regiões especializadas do labelo (GÓMEZ, 2019; MILET-PINHEIRO; GERLACH, 2017; SINGER, 2004).

As plantas de *Catasetum*, são perenes e possuem pseudobulbos carnosos, com base alongada e afinada em direção ao ápice; as folhas membranáceas e lanceoladas são decíduas, passando da coloração verde para a amarela no período de inverno para então caírem; nesse momento a planta se encontra em estado de dormência (BLIND, 2020; FRANKEN; PANSARIN; PANSARIN, 2016). Após a queda das folhas, as raízes podem, além de absorver água e nutrientes, ser responsáveis pelo crescimento e desenvolvimento das plantas produzindo auxinas e favorecendo o acúmulo de ácido indolilacético quando expostas à luz (OLIVEIRA *et al.*, 2019).

Especial atenção é dada a este gênero devido a beleza exótica de suas flores, em especial as masculinas que são maiores e mais coloridas que as femininas, e muito apreciadas no paisagismo interno (BATCHELOR, 1983; SILVA, 2014). A beleza, e conseqüentemente, o valor ornamental exigem do mercado uma maior comercialização do gênero, contudo o lento metabolismo das plantas resulta em baixas taxas de brotação (MAIA; PEDROSO-DE-MORAES, 2017).

Tamanha é a importância das flores, que a família Orchidaceae atualmente dividida em cinco subfamílias, teve sua taxonomia quase que inteiramente baseada em características florais (FREUDENSTEIN; CHASE, 2015). No caso de *Catasetum*, são classicamente subdivididas em 2 subgêneros com base nos estaminódios das flores masculinas, *Pseudocatasetum* com estaminódios rudimentares e *Catasetum* com estaminódios bem desenvolvidos; o último sendo dividido em duas seções Isoceras (estaminódios simétricos) e Anisoceras (estaminódios assimétricos) (FRANKEN, 2017; MILET-PINHEIRO; GERLACH, 2017).

Estudos filogenéticos recentes sugerem que a evolução do gênero, se deu pelas condições e interações ambientais, portanto sua classificação deveria ser baseada em regiões biogeográficas (MAUAD *et al.*, 2022).

As flores são compostas de três sépalas e três pétalas, com a pétala mediana chamada labelo destacada e com glândulas secretoras, atuando como plataforma de pouso para polinizadores (SINGER, 2004). No caso de *Catasetum*, as pólinias são ejetadas quando abelhas tocam as antenas da flor ao raspar o labelo

em busca de compostos aromáticos e estas acabam aderindo no dorso do inseto que procura uma flor diferente, e quando é feminina promove a polinização (MILET-PINHEIRO *et al.*, 2018).

O ovário é ínfero com três carpelos fundidos e após ser polinizado desenvolve em um fruto deiscente (DIRKS-MULDER *et al.*, 2019). Dentro do fruto irão se desenvolver de centenas a milhares de minúsculas sementes. Após a maturação do fruto culminado pela deiscência, tais sementes serão disseminadas pelo vento e irão germinar quando repousarem em uma superfície contendo um fungo micorrízico compatível e recursos minerais.

Conhecer a biologia desse grupo irá promover uma melhor conservação da diversidade de suas plantas. Deste modo, um melhor entendimento dos materiais de reserva das sementes de *Catasetum* pode auxiliar no sucesso da preservação de sementes em bancos de baixas temperaturas e germinação assimbiótica para o gênero.

2.2 Sementes e suas reservas

A família Orchidaceae é conhecida pelas diminutas sementes denominadas “dust seeds” (RASMUSSEN, 1995). São as mais leves dentre as angiospermas pesando entre 0,31 a 24 μg e seu tamanho pode variar de 0,05 a 6,0 mm de comprimento com 0,01 a 0,9 mm de diâmetro, sendo que um fruto pode conter de 50 a 4.000.000 de sementes (ARDITTI; GHANI, 2000; MOLES *et al.*, 2005). Arditti (1967) descreve a semente de orquídea como um pequeno embrião esférico recoberto por uma fina membrana frequentemente transparente, com um característico espaço entre eles preenchido por ar (FAN *et al.*, 2020).

A semente de *Catasetum* é constituída de paredes celulares periclinais com espessamento longitudinal da testa (CHASE; PIPPEN, 1990). O embrião reduzido é composto de poucas células com reservas escassas (BARTHLOTT; GROSSE-VELDMANN; KOROTKOVA, 2014). A baixa reserva de nutrientes é superada pela associação da semente com um fungo micorrízico que propicia a nutrição suficiente nos estágios iniciais do desenvolvimento da planta e pode permanecer em associação ao longo de sua vida (RAVEN, 1999).

Segundo Harrison (1977) a sobrevivência por longos períodos só é possível devido ao lento consumo de suas reservas. As sementes de orquídeas têm

comportamento majoritariamente ortodoxo, o que permite longevidade com redução da temperatura e umidade (MAGRINI *et al.*, 2019; SEATON *et al.*, 2010). Diversos estudos acerca da longevidade de sementes concluíram que a maioria das espécies são tolerantes à dessecação independente da origem geográfica, forma de vida ou habitat (FILETI *et al.*, 2021; HENGLING *et al.*, 2021a; MERRITT *et al.*, 2014).

Pouco se conhece sobre os materiais de reserva das sementes das orquídeas. Sementes em geral possuem endosperma rico proteínas, carboidratos, lipídios, fosfato orgânico e compostos inorgânicos como material de reserva para sua germinação, e sua proporção, composição e distribuição variam amplamente entre os táxons e as espécies. No caso da família Orchidaceae as reservas além de mínimas e estão dentro do embrião pela ausência de endosperma (BASKIN; BASKIN, 2014; BEWLEY *et al.*, 2013).

Dos poucos estudos realizados relativos aos materiais de reserva das sementes de orquídeas, Nikishina e colaboradores (2007) afirmam que a umidade nas sementes está abaixo de 13% e os materiais mais encontrados são lipídios, proteínas e alguns açúcares como, glucose, arabinose, maltose, sacarose e ramnose (KNUDSON, 1925; MANNING; STADEN, 1987; RASMUSSEN, 1990).

Reservas de proteínas em *Cattleya aurantiaca* e no híbrido *Laeliocattleya* estão concentradas no extremo calazal do embrião, sendo a última porção a receber água durante a germinação (HARRISON, 1977; RASMUSSEN, 1995). Foi descrito por Rasmussen (1990) que os corpos de proteínas se dissolvem inicialmente nas células do suspensor e estas aumentam de tamanho e passam a acumular amido, sendo este um processo dependente de água e crucial na germinação de sementes de orquídeas (MANNING; STADEN, 1987; RASMUSSEN, 1995).

A presença de lipídios já foi observada em células da epiderme e parênquima de embriões de *Platanthera hyperborea* (RICHARDSON; PETERSON; CURRAH, 1992). Em sementes de *Cattleya* corpos lipídicos são encontrados no embrião associado à mitocôndria (FILETI *et al.*, 2021; HENGLING *et al.*, 2021a; HEW; YONG, 2004).

No caso de *Phalaenopsis amabile* foram observadas gotículas de lipídios nas células do suspensor ao início do desenvolvimento embrionário. Quanto mais próximas da maturidade, mais corpos lipídicos e proteicos se acumularam no citoplasma das células embrionárias da região apical no lugar de vacúolos de amido. O acúmulo transitório de reservas, foi observado durante o desenvolvimento do

embrião em várias espécies de orquídeas (LEE *et al.*, 2008; SCHWALLIER; BHOOPALAN; BLACKMAN, 2011)

Knudson (1929) detectou a presença de 32% de lipídios em sementes de *Cymbidium*, o que segundo Arditti e Ghani (2000) pode ser comparado com a mesma proporção lipídica encontrada em cocos (*Cocos nucifera*). Informações acerca das reservas de sementes de *Catasetum* não foram encontradas na literatura.

2.3 Viabilidade e conservação de sementes

As alterações no habitat das orquídeas podem colocá-las em perigo ou mesmo levar à extinção, destarte a criação de bancos de sementes é de extrema importância para estratégias de conservação e reintrodução (CARDOSO; TEIXEIRA DA SILVA; VENDRAME, 2016; SEATON; PRITCHARD, 2011).

Seaton *et al.* (2010) discutem a possibilidade sugerida por Knudson de manter sementes de orquídeas por décadas, desde que desidratadas, a -20 °C e em frascos herméticos. Alvarez-Pardo e Ferreira (2006) concluíram que o armazenamento entre 5 °C e -18 °C é altamente eficiente na conservação da viabilidade de sementes com baixo teor de umidade.

A baixa temperatura (-20 °C) e baixa hidratação da semente (até 5%) previne o crescimento de fungos e bactérias e desacelera o envelhecimento das mesmas (MACHADO-NETO; CUSTÓDIO, 2005). Esta metodologia permite armazenar grandes quantidades de sementes, de diversas espécies em um pequeno espaço e com baixo custo de manutenção (VETTORAZZI *et al.*, 2019).

Quando as sementes de orquídeas estão imaturas, suas células estão completamente hidratadas e ativas, e comumente são colocadas para germinar assimbioticamente neste período. Por vezes os frutos de diversas espécies de orquídeas são colhidos após a ruptura ou são dessecados até deiscência de modo a coletar e armazenar as sementes para uso futuro (RASMUSSEN, 1995).

Dá-se preferência ao uso de sementes maduras para germinação assimbiótica, visto que é possível manter a viabilidade sob refrigeração por longos períodos, com menores danos às membranas celulares pela formação de cristais de gelo intracelular durante o congelamento, uma vez que as sementes maduras têm

menor conteúdo de água que as sementes imaturas (GALDIANO-JUNIOR *et al.*, 2017; KITSAKI *et al.*, 2004).

Galdiano-Junior *et al.* (2012) observaram aumento da viabilidade e germinação de sementes de *Dendrobium* quando estas foram colocadas previamente em soluções de vitrificação que promovem a desidratação para criopreservação em nitrogênio líquido. Apesar de eficiente, esse sistema exige mão de obra qualificada e tem custo de manutenção elevado.

É sabido que algumas espécies de orquídeas apresentam dificuldade em germinar após a maturação, o que pode estar relacionado à impermeabilidade da carapaça ou à dormência após a completa maturação do embrião por substâncias inibitórias, dificultando a germinação *in vitro* (MIYOSHI; MII, 1988; YAM *et al.*, 2002). Por vezes a dormência é superada com choque térmico, substâncias químicas como hipoclorito de sódio ou de cálcio e sacarose, ou simples remoção da testa por sonicação (BASKIN; BASKIN, 2021; KILDISHEVA *et al.*, 2020; KUNAKHONNURUK; INTHEMA; KONGBANGKERD, 2018; ZANETTI *et al.*, 2020)

De modo geral, as condições de armazenamento pretendem minimizar a deterioração dos materiais de reserva. A longevidade pode estar relacionada ao conteúdo lipídico das sementes, de modo que sementes com maior quantidade de lipídios possuem menor longevidade (BALLESTEROS; PRITCHARD; WALTERS, 2020; MIRA; ESTRELLES; GONZÁLEZ-BENITO, 2015; WALTERS; BALLESTEROS; VERTUCCI, 2010). Sementes com grandes quantidades de ácido graxos poli-insaturados são altamente suscetíveis a oxidação lipídica, levando a rápida oxidação de suas reservas.

Em organismos tolerantes à dessecação, pode ocorrer cristalização de triacilgliceróis durante o armazenamento, e tais danos podem reduzir ainda mais a viabilidade, logo, a temperatura de armazenamento pode ser crucial para evitar prejuízos às moléculas de lipídios que podem acarretar perda de vigor ou viabilidade (CRANE *et al.*, 2003; MERRITT *et al.*, 2014).

Assim, o entendimento dos materiais de reservas das sementes de orquídeas, neste caso as do gênero *Catasetum*, auxiliará as técnicas de preservação de *ex-situ*, como o armazenamento em baixas temperaturas, tida como uma das metodologias mais fáceis e úteis para conservação de diversidade genética a médio e longo prazo (HIRANO *et al.*, 2005; ROOS; DAVIDSON, 1992).

2.4 Germinação simbiótica

As sementes de orquídeas não possuem endosperma ou cotilédones, e germinam somente após a infecção por um fungo micorrízico (BERNARD, 1909; BURGEFF, 1909; NIKISHINA *et al.*, 2001). São colonizadas por fungos compatíveis e formam uma associação simbiótica. Tais fungos micorrízicos são vitais nas orquídeas em todas as fases do desenvolvimento desde as sementes, protocormos, plântulas e plantas adultas (DEARNALEY; PEROTTO; SELOSSE, 2016).

Alguns autores afirmam que os fungos micorrízicos contribuem para o fornecimento de água para o embrião germinar, ultrapassando a testa que pode ser hidrofóbica (ARDITTI, 1967; RASMUSSEN *et al.*, 2015; YEH *et al.*, 2019). Após a embebição da semente, o fungo passa a fornecer carbono, minerais e vitaminas para o embrião, promovendo crescimento da fase de protocormo até plântula (ERIKSSON; KAINULAINEN, 2011; MANNING; STADEN, 1987; RASMUSSEN *et al.*, 2015).

A associação com os fungos micorrízicos inicia a mobilização das reservas lipídicas e, posteriormente, promove o crescimento e desenvolvimento do embrião (MANNING; STADEN, 1987). A taxa de germinação observada é muito baixa, inferior a 5% (UTAMI; HARIYANTO, 2020; VUDALA; RIBAS, 2017).

Os fungos não possuem apenas a função de promoção da germinação, mas também foi observado indução de resistência à doenças, déficit de água, salinidade, estresse por calor, que podem ser benéficos para o crescimento das plantas na natureza. Potencialmente essas associações podem ter outras funções ainda não descritas (MENG *et al.*, 2019a).

2.5 Germinação assimbiótica

Na ausência de micorrizas, a germinação da semente de orquídea só ocorre na presença de açúcares (ARDITTI; ERNST, 1981; GUPTA, 2016; MANNING; STADEN, 1987).

A germinação de sementes é influenciada pelo estágio de maturidade, genética e necessidade nutricional da espécie, criando uma barreira que limita a germinação *in vitro*, mesmo em espécies não dormentes (ANDERSON, 1991; GUPTA, 2016; JOHNSON, 2011). Para ultrapassar esta barreira na germinação

assimbiótica, açúcares simples são utilizados de modo a iniciar o metabolismo do embrião e promover o desenvolvimento da primeira fase embrionária ao protocormo, produzir raízes e alcançar a fase autotrófica (HEW; YONG, 2004; YAM *et al.*, 2010).

Apesar de um melhor entendimento sobre as necessidades nutricionais específicas das orquídeas ser de extrema importância, o uso de meios de cultura nutritivos Knudson C, MS, VW, juntamente com outros meios simplificados, tem realizado com veemência a função de germinar inúmeras espécies, das mais diversas regiões do globo (CUNHA *et al.*, 2011; GALDIANO JUNIOR; MANTOVANI; MACEDO LEMOS, 2012; KNUDSON, 1946; MURASHIGE; SKOOG, 1962; PEDROSO-DE-MORAES *et al.*, 2009; VACIN; WENT, 1949).

Com o crescimento do comércio de orquídeas nativas, há a necessidade de aumentar a produção *in vitro* para suprir tal demanda de mercado (MULGUND *et al.*, 2011).

A inabilidade de algumas sementes maduras germinarem está atribuída à falta de glioxissomos. Apenas após a intervenção do fungo micorrízico ou adição de carbono simples exógeno, essas organelas serão formadas para promover a quebra dos lipídios e síntese de amido (HARRISON, 1977; MANNING; STADEN, 1987).

Arditti (1992) comparou a germinação simbiótica com a assimbiótica e descreveu que os eventos observados em ambos os casos são os mesmos e promovem com sucesso a germinação, o crescimento e desenvolvimento das plântulas. A germinação assimbiótica é eficiente para germinação em quantidades elevadas de sementes e é adequada para quantificar a viabilidade de materiais armazenados em bancos de sementes de baixas temperaturas (GUPTA, 2016).

Com o tempo, as sementes armazenadas em bancos inevitavelmente envelhecerão. Durante o processo de envelhecimento os componentes químicos das sementes sofrerão danos oxidativos, reduzindo sua capacidade de germinação paulatinamente até a morte dos tecidos (WALTERS; BALLESTEROS; VERTUCCI, 2010). Portanto, antes de germinar o lote que ficou armazenado, é comum que se façam testes de viabilidade por meio do uso de sal de tetrazólio que, de modo indireto, examina a atividade metabólica do embrião (PUSPITANINGTYAS; HANDINI, 2020). Confirmada a respiração celular, as sementes podem passar por outro teste, desta vez para avaliar a germinação efetiva do lote. Esse processo permite que sementes inviáveis sejam descartadas e não se gaste tempo e insumos desnecessariamente.

A conservação de orquídeas pode ser vista como uma questão global preocupante, pois a deterioração de suas populações naturais está em um ritmo alarmante. Isto posto, este trabalho objetivou caracterizar o perfil lipídico de sementes de diferentes espécies de orquídeas do gênero *Catasetum* com uso de cromatografia gasosa e relacionar tal perfil com a condição de armazenamento para preservação, de modo a propor uma metodologia de armazenamento a longo prazo.

Referências

- AGROSTAT. **Estatísticas de Comércio Exterior do Agronegócio Brasileiro**. 2022. Disponível em: <http://indicadores.agricultura.gov.br/agrostat/index.htm>. Acesso em: 12 ago. 2022.
- ALVAREZ-PARDO, V.; FERREIRA, A. G. Armazenamento de sementes de orquídeas. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 28, n. 2, p. 92–98, 2006.
- ANDERSON, A. B. Symbiotic and asymbiotic germination and growth of *Spiranthes magnicamporum* (Orchidaceae). **Lindleyana**, v. 6, p. 183–186, 1991.
- ARDITTI, J. Factors affecting the germination of orchid seeds. **The Botanical Review**, v. 33, n. 1, p. 1–97, 1967.
- ARDITTI, J. **Fundamentals of orchid biology**. New York: Wiley, 1992.
- ARDITTI, J.; ERNST, R. Metabolism of germinating seeds of epiphytic orchids: an explanation for the need for fungal symbiosis. *In*: STEWART, J.; MERWE, C. N. VAN DER (Eds.). **Proceedings of the 10th World Orchid Conference**. Peitermaritzburg: L. Backhouse (Pty), 1981. p. 263–267.
- ARDITTI, J.; GHANI, A. K. A. Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. **New Phytologist**, v. 145, n. 3, p. 367–421, 2000.
- BALLESTEROS, D.; PRITCHARD, H. W.; WALTERS, C. Dry architecture: towards the understanding of the variation of longevity in desiccation-tolerant germplasm. **Seed Science Research**, v. 30, n. 2, p. 142–155, 2020.
- BARBERENA, F. F. V. A.; COSTA, D. L. DE L.; ROCHA JUNIOR, J. A. L. Re-discovery of *Catasetum mojuense* (Orchidaceae: *Catasetinae*), a poorly-known Amazonian species. **Neotropical Biology and Conservation**, v. 15, n. 4, p. 447–452, 2020.

- BARTHLOTT, W.; GROSSE-VELDMANN, B.; KOROTKOVA, N. **Orchid seed diversity: a scanning electron microscopy survey**. Berlin: Botanic Garden and Botanical Museum Berlin-Dahlem, 2014.
- BASKIN, C. C.; BASKIN, J. M. Types of seeds and kinds of seed dormancy. In: BASKIN, C. C.; BASKIN, J. M. (Eds.). **Seeds: Ecology, biogeography, and evolution of dormancy and Germination**. 2nd. ed. Lexington, Kentucky, USA: Elsevier, 2014. p. 37–77.
- BASKIN, J. M.; BASKIN, C. C. The great diversity in kinds of seed dormancy: A revision of the Nikolaeva-Baskin classification system for primary seed dormancy. **Seed Science Research**, v. 31, n. 4, p. 249–277, 2021.
- BATCHELOR, S. R. Beginner's Series 26, *Catasetum* and *Cycnoches* - Part 2 - *Catasetums* with Unisexual Flowers. **American Orchid Society Bulletin**, v. 52, n. 7, p. 713–722, 1983.
- BERNARD, N. L'évolution dans la symbiose. Les orchidées et leurs champignons commensaux. **Annales des Sciences Naturelles, Botanique**, v. 9, p. 1–196, 1909.
- BEWLEY, J. D. *et al.* **Seeds: Physiology of development, germination and dormancy**. 3. ed. New York, USA: Springer, 2013.
- BLIND, A. D. Nova espécie de Orquidaceae (*Catasetinae*) para o estado do Amazonas, Brasil. **Brazilian Applied Science Review**, v. 4, n. 1, p. 131–143, 2020.
- BRASIL, F. F. **Orchidaceae in flora e funga do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB179>. Acesso em: 12 ago. 2022.
- BURGEFF, H. **Die Wurzelpilze Der Orchideen**. Jena, Germany: Verlag Von Gustav Fischer, 1909.
- CALLAWAY, R. M. *et al.* Epiphyte host preferences and host traits: Mechanisms for species-specific interactions. **Oecologia**, v. 132, n. 2, p. 221–230, 2002.
- CAMPACCI, M. A. *et al.* Coletânea de Orquídeas Brasileiras - Novas espécies (e híbridos naturais). **Coletânea de Orquídeas Brasileiras**, v. 15, p. 594–597, 2019.
- CANTUÁRIA, P. DE C. *et al.* *Catasetum* × *sheyllae* (Orchidaceae: *Catasetinae*), a new natural hybrid from Brazilian Amazon. **Phytotaxa**, v. 527, n. 4, p. 257–265, 2021.
- CARDOSO, J. C.; TEIXEIRA DA SILVA, J. A.; VENDRAME, W. A. Impacts of deforestation on some orchids of São Paulo State, Brazil. **Natureza e Conservação**, v. 14, n. 1, p. 28–32, 2016.

- CHASE, M. W.; PIPPEN, J. S. Seed morphology and phylogeny in subtribe *Catasetinae* (Orchidaceae). **Lindleyana**, v. 5, n. 2, p. 126–133, 1990.
- CHIRON, G.; MARÇAL, S. Une seizième espèce de *Catasetum* (Orchidaceae) de Bahia (Brésil). **Richardiana**, v. 3, p. 31–38, 2019.
- CHUGH, S.; GUHA, S.; RAO, I. U. Micropropagation of orchids: A review on the potential of different explants. *Scientia Horticulturae*, v. 122, n. 4, p. 507–520, 2009.
- COLVILLE, L. *et al.* Development of a reliable GC-MS method for fatty acid profiling using direct transesterification of minimal quantities of microscopic orchid seeds. **Seed Science Research**, v. 26, n. 1, p. 84–91, 2015.
- CRANE, J. *et al.* Triacylglycerols determine the unusual storage physiology of *Cuphea* seed. **Planta**, v. 217, n. 5, p. 699–708, 2003.
- CRIBB, P. J. *et al.* Orchid conservation: a global perspective. In: DIXON, K. W. *et al.* (Eds.). **Orchid Conservation**. Kota Kinabalu, Sabah, Malasia: Sabah Natural History Publications, 2003. p. 1–24.
- CUNHA, T. *et al.* Desenvolvimento *in vitro* de *Laeliocattleya schilleriana* Rolfe em meios de cultivo simplificados. **Scientia Plena**, v. 7, n. 8, p. 1–5, 2011.
- DEARNALEY, J.; PEROTTO, S.; SELOSSE, M. A. Structure and development of orchid mycorrhizas. In: MARTIN, F. (Ed.). **Molecular mycorrhizal symbiosis**. Hoboken, New Jersey, USA: John Wiley & Sons, 2016. p. 63–86.
- DIANTINA, S. *et al.* Seed viability and fatty acid profiles of five orchid species before and after ageing. **Plant Biology**, v. 24, n. 1, p. 168–175, 2022.
- DIRKS-MULDER, A. *et al.* Morphological and molecular characterization of orchid fruit development. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 1–18, 2019.
- DRESSLER, R. L. Introduction. In: PRIDGEON, A. M. (Ed.). **Phylogeny and classification of the orchid family**. Portland Oregon, USA: Dioscorides Press, 1993. p. 7–12.
- EKMEKÇİGİL, M. *et al.* High-frequency protocorm-like bodies and shoot regeneration through a combination of thin cell layer and RITA® temporary immersion bioreactor in *Cattleya forbesii* Lindl. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 136, n. 3, p. 451–464, 2019.
- ERIKSSON, O.; KAINULAINEN, K. The evolutionary ecology of dust seeds. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, v. 13, n. 2, p. 73–87, 2011.

- FAN, X.-L. *et al.* Transitions between the terrestrial and epiphytic habit drove the evolution of seed-aerodynamic traits in orchids. **The American Naturalist**, v. 195, n. 2, p. 275–283, 2020.
- FARIA, R. T. *et al.* **Orquídeas do Gênero *Catasetum* no Brasil**. Londrina: Mecenias, 2016.
- FERREIRA, U. L. C. Two new natural hybrids in *Catasetum* (Orchidaceae) from Centre-West Brazil. **Richardiana**, v. 3, p. 80–91, 2019.
- FERREIRA, U. L. C.; FILHO, R. M. D. C. Two new natural hybrids in *Catasetum* (Orchidaceae) from Brazil. **Richardiana**, v. 3, p. 39–49, 2019.
- FILETI, J. *et al.* Seed longevity and cryobiotechnology in the orchid genus *Cattleya*. **Cryoletters**, v. 42, n. 6, p. 356–365, 2021.
- FRANKEN, E. P. **Biologia floral comparada do gênero *Catasetum* Rich. ex Kunth (Orchidaceae, *Catasetinae*) baseado em estudos filogenéticos**. 2017. Tese (Doutor em Ciências) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, 2017.
- FRANKEN, E. P.; PANSARIN, L. M.; PANSARIN, E. R. Osmophore diversity in the *Catasetum cristatum* alliance (Orchidaceae: *Catasetinae*). **Lankesteriana**, v. 16, n. 3, p. 317–327, 2016.
- FREUDENSTEIN, J. V.; CHASE, M. W. Phylogenetic relationships in Epidendroideae (Orchidaceae), one of the great flowering plant radiations: Progressive specialization and diversification. **Annals of Botany**, v. 115, n. 4, p. 665–681, 2015.
- GALDIANO-JUNIOR, R. F. *et al.* Cryopreservation of *Dendrobium* hybrid seeds and protocorms as affected by phloroglucinol and Supercool X1000. **Scientia Horticulturae**, v. 148, p. 154–160, 2012.
- GALDIANO-JUNIOR, R. F. *et al.* Seed cryopreservation, *in vitro* propagation and *ex vitro* growth of *Cattleya walkeriana* Gardner, a vulnerable ornamental orchid. **Australian Journal of Crop Science**, v. 11, n. 4, p. 485–490, 2017.
- GALDIANO JUNIOR, R. F.; MANTOVANI, C.; MACEDO LEMOS, E. G. Propagação *in vitro* de *Cattleya trianaei* (Linden & Reichenbach fil.) (Orchidaceae) em meios de culturas e com doses de fertilizante comercial. **Comunicata Scientiae**, v. 3, n. 3, p. 210–214, 2012.
- GIVNISH, T. J. *et al.* Orchid phylogenomics and multiple drivers of their extraordinary diversification. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 282, n. 1814, 2015.

- GIVNISH, T. J. *et al.* Orchid historical biogeography, diversification, Antarctica and the paradox of orchid dispersal. **Journal of Biogeography**, v. 43, n. 10, p. 1905–1916, 2016.
- GÓMEZ, A. DE J. L. **La polinización en las orquídeas de Latinoamérica**. 2019. Monografía (Licenciado em Biologia) – Instituto de Ciencias Biológicas - Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, 2019.
- GOVAERTS, R. *et al.* **World Checklist of Orchidaceae. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew**. Disponível em: <http://wcsp.science.kew.org/>. Acesso em: 12 ago. 2022.
- GRAVENDEEL, B. *et al.* Epiphytism and pollinator specialization: drivers for orchid diversity? **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 359, p. 1523–1535, 2004.
- GUPTA, A. Asymbiotic seed germination in orchids: role of organic additives. **International Advanced Research Journal in Sciences, Engineering and Technology**, v. 3, n. 5, p. 143–147, 2016.
- HARRISON, C. R. Ultrastructural and histochemical changes during the germination of *Cattleya aurantiaca*. **Botanical Gazette**, v. 138, n. 1, p. 41–45, 1977.
- HASSLER, M. **World Orchids. Synonymic Checklist and Distribution of the Orchids of the World**. Version 12.11; last update March 7th, 2022. Disponível em: www.worldplants.de/orchids/. Acesso em: 28 mar. 2022.
- HENGLING, M. M. *et al.* Storage of Brazilian *Cattleya* seeds from diverse biomes: lipid composition and effects on germination. **Plant Biosystems**, v. 155, n. 3, p. 487–497, 2021.
- HEW, C. S.; YONG, J. W. H. **The physiology of tropical orchids in relation to the industry**. 2nd. ed. Singapore: World Scientific Publishing Co Inc, 2004.
- HINSLEY, A. *et al.* Estimating the extent of CITES noncompliance among traders and end-consumers; lessons from the Global Orchid Trade. **Conservation Letters**, v. 10, n. 5, p. 602–609, 2017.
- HIRANO, T. *et al.* Cryopreservation of immature seeds of *Bletilla striata* by vitrification. **Plant Cell Reports**, v. 23, p. 534–539, 2005.
- JOHNSON, T. R. **Developing a model of orchid seed germination: *in vitro* studies of the threatened Florida species *Bletia purpurea***. 2011. Dissertação (Mestrado) - University of Florida, 2011.

- KILDISHEVA, O. A. *et al.* Dormancy and germination: making every seed count in restoration. **Restoration Ecology**, v. 28, n. S3, p. S256–S265, 2020.
- KITSAKI, C. K. *et al.* *In vitro* germination, protocorm formation and plantlet development of mature versus immature seeds from several *Ophrys* species (Orchidaceae). **Plant Cell Reports**, v. 23, n. 5, p. 284–290, 2004.
- KNUDSON, L. Physiological study of the symbiotic germination of orchid seeds. **Botanical Gazette**, v. 79, n. 4, p. 345–379, 1925.
- KNUDSON, L. Physiological investigations on orchid seed germination. **Proceedings of the International Congress of Plant Science**, v. 2, p. 1183–1189, 1929.
- KNUDSON, L. A new nutrient solution for germination of orchid seed. **American Orchid Society Bulletin**, v. 15, p. 214–217, 1946.
- KRAHL, A. H. *et al.* *Catasetum saracataquerense* (Orchidaceae, *Catasetinae*), a new species from Brazilian Amazon. **Richardiana**, v. 5, p. 206–216, 2021.
- KRAHL, A. H. *et al.* *Catasetum marinhoi* (Orchidaceae, *Catasetinae*), a new species of Brazilian Amazon. **Richardiana**, v. 6, p. 100–110, 2022.
- KRAHL, D. R. P.; KRAHL, A. H.; CHIRON, G. R. *Catasetum × louisiae* (Orchidaceae: *Catasetinae*), a new natural hybrid for the Brazilian Amazon. **Richardiana**, v. 4, p. 214–223, 2020.
- KUNAKHONNURUK, B.; INTHEMA, P.; KONGBANGKERD, A. *In vitro* propagation of *Epipactis flava* Seidenf., an endangered rheophytic orchid: a first study on factors affecting asymbiotic seed germination, seedling development and greenhouse acclimatization. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 135, n. 3, p. 419–432, 2018.
- LEE, Y. I. *et al.* Embryology of *Phalaenopsis amabilis* var. *formosa*: Embryo development. **Botanical Studies**, v. 49, n. 2, p. 139–146, 2008.
- LI, M. H. *et al.* A perspective on crassulacean acid metabolism photosynthesis evolution of orchids on different continents: *Dendrobium* as a case study. **Journal of Experimental Botany**, v. 70, n. 22, p. 6611–6619, 2019.
- MACHADO-NETO, N. B.; CUSTÓDIO, C. C. Orchid conservation through seed Banking: Ins and Outs. **Selbyana**, v. 25, n. 2, p. 229–235, 2005.
- MAGRINI, S. *et al.* Seed banking of terrestrial orchids: evaluation of seed quality in *Anacamptis* following 4-year dry storage. **Plant Biology**, v. 21, n. 3, p. 544–550, 2019.

- MAIA, J. A. S.; PEDROSO-DE-MORAES, C. Influence of different concentrations of jasmonic acid on *in vitro* development of *Catasetum fimbriatum* Lindl. (Orchidaceae). **Modern Phytomorphology**, v. 11, p. 99–104, 2017.
- MANNING, J. C.; STADEN, J. VAN. The development and mobilisation of seed reserves in some African orchids. **Australian Journal of Botany**, v. 35, n. 3, p. 343–353, 1987.
- MASTERS, S. *et al.* Patent analysis as a novel method for exploring commercial interest in wild harvested species. **Biological Conservation**, v. 243, n. June 2019, p. 108454, 2020.
- MAUAD, A. V. S. R. *et al.* Phylogenetic and molecular dating analyses of *Catasetum* (Orchidaceae) indicate a recent origin and artificial subgeneric groups. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 45, n. 4, p. 1235–1247, 2022.
- MENG, Y. Y. *et al.* Symbiotic fungi undergo a taxonomic and functional bottleneck during orchid seeds germination: a case study on *Dendrobium moniliforme*. **Symbiosis**, v. 79, n. 3, p. 205–212, 2019.
- MERRITT, D. J. *et al.* *Ex-situ* conservation and cryopreservation of orchid germplasm. **International Journal of Plant Sciences**, v. 175, n. 1, p. 46–58, 2014.
- MILET-PINHEIRO, P. *et al.* Notes on pollination ecology and floral scent chemistry of the rare neotropical orchid *Catasetum galeritum* Rchb.f. **Plant Species Biology**, v. 33, n. 2, p. 158–163, 2018.
- MILET-PINHEIRO, P.; GERLACH, G. Biology of the Neotropical orchid genus *Catasetum*: A historical review on floral scent chemistry and pollinators. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, v. 27, n. June, p. 23–34, 2017.
- MIRA, S. *et al.* Lipid thermal fingerprints of long-term stored seeds of Brassicaceae. **Plants**, v. 8, n. 10, p. 414, 2019.
- MIRA, S.; ESTRELLES, E.; GONZÁLEZ-BENITO, M. E. Effect of water content and temperature on seed longevity of seven Brassicaceae species after 5 years of storage. **Plant Biology**, v. 17, n. 1, p. 153–162, 2015.
- MIYOSHI, K.; MII, M. Ultrasonic treatment for enhancing seed germination of terrestrial orchid, *Calanthe discolor*, in asymbiotic culture. **Scientia Horticulturae**, v. 35, p. 127–130, 1988.
- MOLES, A. T. *et al.* A brief history of seed size. **Science**, v. 307, n. 5709, p. 576–580, 2005.

- MORALES, M. M. B. *et al.* Diversidad y conservación de *Catasetum* (Orchidaceae: *Catasetinae*) en el Departamento de Santander, Colombia. **Ciencia En Desarrollo**, v. 7, n. 2, p. 57–65, 2016.
- MULGUND, G. S. *et al.* TDZ induced *in vitro* propagation of an epiphytic orchid *Xenikophyton smeeanum* (Reichb. f.). **Research in Plant Biology**, v. 1, n. 4, p. 7–15, 2011.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473–497, jul. 1962.
- NIKISHINA, T. V. *et al.* Cryopreservation of seeds of some tropical orchids. **Doklady Biochemistry and Biophysics**, v. 378, n. 4, p. 555–557, 2001.
- NIKISHINA, T. V. *et al.* Cryopreservation of seeds and protocorms of rare temperate orchids. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 54, n. 1, p. 121–127, 2007.
- OLIVEIRA, P. M. R. *et al.* Exposure of *Catasetum fimbriatum* aerial roots to light coordinates carbon partitioning between source and sink organs in an auxin dependent manner. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 135, p. 341–347, 2019.
- PEDROSO-DE-MORAES, C. *et al.* As orquídeas e o mercado. **Boletim da Coordenadoria das Associações Orquidófilas do Brasil (CAOB)**, v. 66, p. 36–42, 2007.
- PEDROSO-DE-MORAES, C. *et al.* Desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya loddigesii* Lindley (Orchidaceae) utilizando fertilizantes comerciais. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 7, n. 1, p. 67–69, 2009.
- PETINI-BENEILLI, A. **Orquídeas de Mato Grosso - Genus *Catasetum* L. C. Rich ex Kunth**. Rio de Janeiro: PoD Editora, 2012. 130 p.
- PETINI-BENEILLI, A. ***Catasetum* in Flora e Funga do Brasil**. Disponível em: <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB11312>. Acesso em: 12 ago. 2022.
- PETINI-BENEILLI, A.; CHIRON, G. R. Nouvelle espèce de *Catasetum* (Orchidaceae) du Mato Grosso (Brésil). **Richardiana**, v. 2, p. 8–17, 2018.
- PETINI-BENEILLI, A.; IZZO, T. J. *Catasetum brasilandense* (Orchidaceae), a new species from Mato Grosso, Brazil. **Richardiana**, v. 1, p. 51–62, 2017.
- PETINI-BENEILLI, A.; SOARES-LOPES, C. R. A. New taxa of *Catasetum* (Orchidaceae, *Catasetinae*) from Mato Grosso, Brazil. **Richardiana**, v. 1, p. 31–43, 2017.

- PFEIFER, M.; HEINRICH, W.; JETSCHKE, G. Climate, size and flowering history determine flowering pattern of an orchid. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 151, n. 4, p. 511–526, 2006.
- PROBERT, R. *et al.* Seed quality for conservation is critically affected by pre-storage factors. **Australian Journal of Botany**, v. 55, n. 3, p. 326–335, 2007.
- PUSPITANINGTYAS, D. M.; HANDINI, E. *Ex-situ* conservation of *Cymbidium finlaysonianum* by seed storage. **Biodiversitas**, v. 21, n. 8, p. 3519–3524, 2020.
- RASMUSSEN, H. N. Cell differentiation and mycorrhizal infection in *Dactylorhiza majalis* (Rchb. f.) Hunt & Summerh. (Orchidaceae) during germination *in vitro*. **New Phytologist**, v. 116, n. 1, p. 137–147, 1990.
- RASMUSSEN, H. N. **Terrestrial Orchids: From Seed to Mycotrophic Plant**. New York, USA: Cambridge University Press, 1995.
- RASMUSSEN, H. N. *et al.* Germination and seedling establishment in orchids: A complex of requirements. **Annals of Botany**, v. 116, n. 3, p. 391–402, 2015.
- RAVEN, J. A. The minimum size of seeds and spores in relation to the ontogeny of homoiohydric plants. **Functional Ecology**, v. 13, n. 1, p. 5–14, 1999.
- RHS. **Alphabetical list of standard abbreviations for natural and hybrid generic names**. 2017.
- RICHARDSON, K. A.; PETERSON, R. L.; CURRAH, R. S. Seed reserves and early symbiotic protocorm development of *Platanthera hyperborea* (Orchidaceae). **Canadian Journal of Botany**, v. 70, n. 2, p. 291–300, 1992.
- ROOS, E. E.; DAVIDSON, D. A. Record longevities of vegetable seeds in storage. **HortScience**, v. 27, n. 5, p. 393–396, 1992.
- SCHIFF, J. L. History of Orchids. In: SCHIFF, J. L. (Ed.). **Rare and Exotic Orchids**. Auckland, New Zealand: Springer, 2018. p. 1–27.
- SCHWALLIER, R.; BHOOPALAN, V.; BLACKMAN, S. The influence of seed maturation on desiccation tolerance in *Phalaenopsis amabilis* hybrids. **Scientia Horticulturae**, v. 128, n. 2, p. 136–140, 2011.
- SEATON, P. T. *et al.* *Ex-situ* conservation of Orchids in a warming world. **Botanical Review**, v. 76, n. 2, p. 193–203, 2010.
- SEATON, P. T.; PRITCHARD, H. W. Life in the freezer - Orchid seed banking for the future. **Orchids**, v. 77, n. 10, p. 762–773, 2008.

- SILVA, A. B. DA. **Morfometria floral, comparação anatômica e citogenética de *Catasetum C. Rich ex Kunt.*** 2014. Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado de Mato Grosso, 2014.
- SINGER, R. B. **Orquídeas Brasileiras e Abelhas.** 2004. Disponível em: http://www.webbee.org.br/projetos/singer/texto_singer.pdf. Acesso em: 28 set. 2021.
- SULTANA, K. S. *et al.* Effect of hyaluronic acid (HA) on organogenesis in protocorm-like bodies (PLBs) of *Phalaenopsis* 'Fmk02010' cultured *in vitro*. **American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences**, v. 15, n. 9, p. 1721–1724, 2015.
- TEOH, E. S. Medicinal Orchids of Central America - Chapter 9. *In*: TEOH, E. S. (Ed.). **Orchids as Aphrodisiac, Medicine or Food.** Singapore: Springer Nature Switzerland, 2019a. p. 139–158.
- TEOH, E. S. Medicinal Orchids of South America - Chapter 10. *In*: TEOH, E. S. (Ed.). **Orchids as Aphrodisiac, Medicine or Food.** Singapore: Springer Nature Switzerland, 2019b. p. 159–171.
- TRÁVNÍČEK, P. *et al.* Diversity in genome size and GC content shows adaptive potential in orchids and is closely linked to partial endoreplication, plant life-history traits and climatic conditions. **New Phytologist**, v. 224, n. 4, p. 1642–1656, 2019.
- UNRUH, S. A. *et al.* Phylotranscriptomic analysis and genome evolution of the Cypripedioideae (Orchidaceae). **American Journal of Botany**, v. 105, n. 4, p. 631–640, 2018.
- USDA. Floriculture Crops 2020 Summary. United States Department of Agriculture, National Agricultural Statistics Service. **Agriculture Counts**, p. 1–63, 2021.
- UTAMI, E. S. W.; HARIYANTO, S. Organic compounds: contents and their role in improving seed germination and protocorm development in orchids. **International Journal of Agronomy**, v. 2020, p. 1–12, 2020.
- VACIN, E. F.; WENT, F. W. Some pH changes in nutrient solutions. **Botanical Gazette**, v. 110, n. 4, p. 605–613, 1949.
- VALSKO, J. J. *et al.* *Catasetum sophiae*, a new species of Orchidaceae (*Catasetinae*) from northern Brazil. **Phytotaxa**, v. 402, n. 2, p. 114–120, 2019.
- VETTORAZZI, R. G. *et al.* Cryopreservation of immature and mature seeds of Brazilian orchids of the genus *Cattleya*. **Scientia Horticulturae**, v. 256, p. 108603, 2019.

- VUDALA, S. M.; RIBAS, L. L. F. Seed storage and asymbiotic germination of *Hadrolaelia grandis* (Orchidaceae). **South African Journal of Botany**, v. 108, p. 1–7, 2017.
- WALTERS, C.; BALLESTEROS, D.; VERTUCCI, V. A. Structural mechanics of seed deterioration: Standing the test of time. **Plant Science**, v. 179, n. 6, p. 565–573, 2010.
- YAM, T. W. *et al.* Embryology-seeds. *In*: KULL, T.; ARDITTI, J. (Eds.). **Orchid Biology: Reviews and Perspectives, VIII**. 2002. p. 288–377.
- YAM, T. W. *et al.* Conservation of the Native Orchids Through Seedling Culture and Reintroduction — A Singapore Experience. **The Botanical Review**, v. 76, p. 263–274, 2010.
- YEH, C. M. *et al.* New insights into the symbiotic relationship between orchids and fungi. **Applied Sciences (Switzerland)**, v. 9, n. 3, p. 1–14, 2019.
- ZANETTI, M. *et al.* Seed functional traits provide support for ecological restoration and *ex-situ* conservation in the threatened Amazon ironstone outcrop flora. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 1–17, 2020.
- ZIMMERMAN, J. K. Ecological correlates of labile sex expression in the orchid *Catasetum viridiflavum*. **Ecology**, v. 72, n. 2, p. 597–608, 1991.

3 CAPÍTULO I - The influence of pretreatment on germination of three species of *Catasetum* (Orchidaceae) ¹

Abstract

Asymbiotic germination techniques are successful in species of the *Catasetum* genus. The diverse composition of the culture media can be critical; however, viable seeds are required for asymbiotic germination. The reliable method for viability assessment is the tetrazolium test. A decisive step in the efficiency of the tetrazolium test is the seeds preconditioning with sucrose solution, which has the potential to improve germination. Therefore, this work aimed to evaluate the seed germination of three species of the genus *Catasetum* in culture media, preconditioned or not with sucrose solution. Seeds of the species *Catasetum osculatum*, *Ctsm*. galeritum* and *Ctsm. complanatum* were assessed by tetrazolium test and germinated in two different media, pretreated or not with 10% sucrose solution. The statistical analysis showed that the use of sucrose pretreatment significantly increased the germination rates of the species. We conclude that the pretreatment with 10% sucrose for 24 hours, regardless of the species and the culture medium, significantly increases the germination of *Ctsm. complanatum*, *Ctsm. galeritum* and *Ctsm. osculatum* seeds.

Index terms: orchid, plant culture, seeds, sucrose solution, tetrazolium.

3.1 Introduction

The species within the Orchidaceae family have low occurrence in populations and are restricted to small forest fragments (DAVIÑA *et al.*, 2009). The disturbance of these habitats and the indiscriminate collection placed many species at risk (HIRANO *et al.*, 2005). The genus *Catasetum* comprises 121 species, which 92 are endemic to Brazil (PETINI-BENELLI, 2022), all suffering from continuous habitat destruction, unbalancing the flowering and fruiting percentages along with

¹ Artigo apresentado na íntegra, conforme aceito para publicação na revista Journal of Seed Science. Autores: Milena Cristina Moraes, Mônica Rosa Bertão, Ceci Castilho Custódio, Nelson Barbosa Machado-Neto.

other genera (CARDOSO; TEIXEIRA DA SILVA; VENDRAME, 2016; PETINI-BENELLI, 2016). Most of the *Catasetum* species have no information on the threat status, making a real assessment of its situation impossible (PETINI-BENELLI, 2022).

To avoid the over collection of plants from natural populations, since the germination rate in nature is low (<5%), one solution is to produce high numbers of plants through asymbiotic germination techniques (ARDITTI; ERNST, 1993; UTAMI; HARIYANTO, 2020) and turn them easily available to the consumers (SEATON; PRITCHARD, 2011). With this methodology, *in vitro* germination, it is possible to supply carbon to the embryo to fulfill the energy needs that would be provided in nature by mycorrhizal fungi (ZHANG *et al.*, 2013).

Germination occurs differentially among orchid species. For epiphytic species, such as *Cattleya* (FILETI *et al.*, 2021; HENGLING *et al.*, 2020), the embryo swells, breaks up the testae, and turns green. For terrestrials, the embryo swells, fulfil the testae before breaking it up and stay white for long, emitting rhizoids and leaf primordia before becoming green (SEATON; RAMSAY, 2005). *Catasetum* species, even being an epiphytic genus, follows the germination pattern of the terrestrials. Although many authors show prominent results for asymbiotic germination in the *Catasetum* genus (FERREIRA *et al.*, 2018; ZAKIZADEH; KAVIAN; HASHEMABADI, 2019), for the species *Catasetum galeritum*, *Ctasm. osculatum* e *Ctasm. complanatum*, Brazilian endemics (PETINI-BENELLI, 2021), which exist in environments subjected to high anthropic pressure, has no data available until now. Some authors point out that the composition of the medium can be critical to achieving high germination rates, as the formulation can be specific to the genus or even the species (DIANTINA *et al.*, 2020; SUZUKI *et al.*, 2012).

The different formulations and compounds quantities, as well as the nutrients available (organic or inorganic), are crucial for germination in different species. Determining an ideal medium can improve large-scale production and contribute to the conservation of threatened species (SUZUKI *et al.*, 2012).

The culture media are diverse, and the MS medium is the most common of all (MURASHIGE; SKOOG, 1962). Another important medium, recommended especially for terrestrial species, is the MM, Malmgren medium (1996), which effectiveness was not yet evaluated for the germination of the *Catasetum* genus. The main difference is the presence of nitric nitrogen in high concentrations in MS

medium, which has an inhibitory effect in the germination of some terrestrials (FIGURA *et al.*, 2020; PONERT *et al.*, 2013), in the Malmgren medium nitric nitrogen is absent.

Nevertheless, viable seeds are necessary for asymbiotic germination. The most common, practical, and reliable method is the tetrazolium test, which has the potential to assess the seed viability and quality (HOSOMI *et al.*, 2011, 2012; VUDALA; RIBAS, 2017). A decisive step in the efficiency of the tetrazolium test is the seeds preconditioning with sucrose solution. This stage aims to hydrate evenly and activate the embryo's metabolism (GEORGE; HALL; KLERK, 2008). To increase seed germination, this step would be of good improvement for the germination rates.

Therefore, this work aimed to evaluate if the pretreatment step with sucrose before seed germination of three species of the genus *Catasetum* in culture media can increase germination rates.

3.2 Material and methods

3.2.1 Seed Collection and storage

Seeds of *Catasetum osculatum* K.G.Lacerda & V.P.Castro, *Ctsm. galeritum* Rchb.f. and *Ctsm. complanatum* F.E.L.Miranda & K.G.Lacerda (Table 1) were produced by crossings, as this genus exhibits sexual dimorphism, in Bela Vista Orchids (Assis – SP, -22.67299 -50.41754). At dehiscence seeds were removed from capsules, put in paper envelopes and these were kept over silica gel for three days at 25 °C. They were then transferred to cryotubes and stored at -18 °C, according the OSSSU protocol (Orchid Seed Science and Sustainable Use Seed Bank (Seaton and Pritchard, 2008), at the University of West of São Paulo (UNOESTE – Presidente Prudente – SP).

Table 3.1 - *Catasetum* species, their place of origin and conservation status.

<i>Catasetum</i> species	Origin ¹	Conservation Status ¹
<i>Ctasm.² osculatum</i>	Pará, Rondônia, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso	NE ³
<i>Ctasm. galeritum</i>	Amazonas, Pará, Tocantins, Maranhão, Mato Grosso	NE
<i>Ctasm. complanatum</i>	Rondônia, Mato Grosso	NE

3.2.2 Seed viability

Initial viability was assessed using the tetrazolium test, according to Hosomi *et al.* (2011). Portions of 5 mg seeds of each species were placed in microtubes at room temperature for 15 minutes, then add 1.0 mL of 10% sucrose solution and kept for 24 hours at room temperature. After this period, the liquid was removed and the seeds rinsed twice with distilled water, followed by the addition of 1.0 mL of 1% tetrazolium salt (2,3,5 triphenyl tetrazolium chloride) solution and kept in a water bath at 40 °C for 24 hours. Finally, the solution was removed and the seeds rinsed with distilled water.

The seed samples were placed on glass slides to obtain the images. The seeds with red embryos were considered as viable, while seeds with white embryos as non-viable. Empty seeds without an embryo, were not take into account.

3.2.3 Seed germination

Each species was divided into two subsamples for germination: one pretreated for 24 hours in a 10% sucrose solution, and the other did not receive any treatment. Samples were placed in microtubes at room temperature before the pretreatment. All subsamples were disinfected with 3% sodium dichloroisocyanurate solution (DCCA), added with Tween 80 for 10 minutes in a laminar flow chamber, and shaken occasionally (MACHADO NETO; CUSTÓDIO, 2005). After this period,

¹ Flora e Funga do Brasil (PETINI-BENELLI, 2022).

² Abbreviations of scientific names followed the rules of Royal Horticultural Society for orchid genera and hybrids (RHS, 2017).

³ NE – Not evaluated

samples were rinsed twice with sterile water and distributed in Petri dishes containing nutrient medium.

The chosen media for germination were the half concentration MS media, with 1% agar and 2% sucrose, and the MM medium described by Malmgren plus MS vitamins, 1% agar and 1% sucrose. The pH for both media was 5.7 before autoclaving at 121 °C for 15 minutes and subsequently were distributed in 60 mm Petri dishes.

Pretreated and not-pretreated seeds were sowed in a laminar flow chamber according to Machado Neto and Custódio (2005). Three Petri dishes were used per treatment, sealed with PVC film and transferred to a growth room at $25 \pm 3^\circ\text{C}$ with a 16 h light / 8 h dark. Germination was evaluated weekly in nine selected areas containing at least 30 seeds per area. Only seeds whose embryo were in stage 1 of germination, meaning swelled and rhizoid protrusion (PEREIRA *et al.*, 2011; SEATON; RAMSAY, 2005; ZETTLER; HOFER, 1998) were counted as germinated; the evaluation continued until germination stabilized. A camera attached to a stereoscope microscope obtained high-definition quality images for evaluation in Gnu Image Manipulation Program.

The Germination Speed Index, described by Maguire (1962) and modified by Hosomi *et al.* (2012) for orchids, was also evaluated, as in the following formula:

$$\text{GSI} = G1 / N1 + G2 / N2 + \dots + Gn / Nn$$

Where G is the number of germinated seeds per period, and N is the time in days after germination. Germination is evaluated weekly; therefore, the time intervals were 7, 14, 21, and so forth until germination stabilization.

3.2.4 Experimental design and statistical analysis

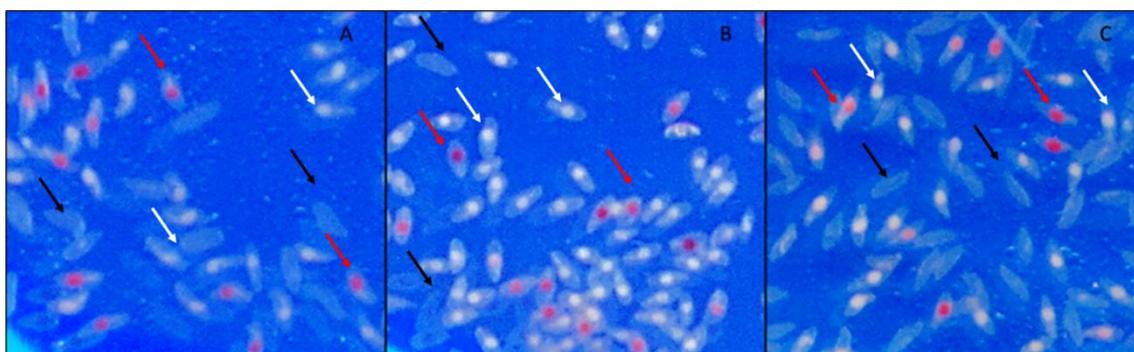
The work was carried out in triplicate in a completely randomized design with a triple factorial arrangement of species x preconditioning x culture medium (3 x 2 x 2).

Normality and homogeneity of the results were initially checked for the germination and GSI data so that it could be subjected to analysis of variance (ANOVA). Then the means were compared by the Tukey test at 5% probability. Statistical analysis was made using the software SISVAR 5.7 (FERREIRA, 2011).

3.3 Results and Discussion

Viability was assessed utilizing the tetrazolium test by the methodology proposed by Hosomi *et al.* (2011, 2012) (Figure 3.1). We could observe seeds with viable embryos stained in red (Figure 3.1, red arrows); non-viable embryos were not stained (white arrow, Figure 3.1) and empty testa (Figure 3.1, black arrows). The observed results shown that viability was 44.13% for *Ctasm. complanatum*, 21.13% for *Ctasm. galetirum* and 21.95% for *Ctasm. osculatum*. Although not considered for the viability test, we detected in the total amount of seeds 53.64% of empty testae for *Ctasm. osculatum*, 28.07% for *Ctasm. complanatum*, and 5.73% for *Ctasm. galeritum* (Table 3.2 and Figure 3.1).

Figure 1. Stained seeds of *Catasetum complanatum* (A), *Catasetum galeritum* (B) and *Catasetum osculatum* (C), with the 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride (TZ). Viable seeds show embryo stained in red (red arrows), empty seed are indicated by black arrows and non-viable seed are indicated by white arrows.



The analysis of the triple factorial of species, pretreatment, and culture medium showed no interaction between them (Table 3.3). Only the use of sucrose pretreatment significantly increased the germination rate (Table 3.3 and Figure 3.2). there was no difference in comparing the performance of the culture media MS and MM, as observed in not pre-treated seeds of *Cyrtopodium aliciae* (OLIVEIRA *et al.*, 2023).

The germination averages for all treatments can be seen in Table 3.4. The treatment without sucrose addition for *Ctasm. complanatum*, *Ctasm. galeritum* and *Ctasm. osculatum* germinated, 4.70%, 2.87% and 6.39% respectively, while pretreatment with 10% sucrose solution, germination had higher means of 57.31%

for *Ctsm. complanatum*, 25.80% for *Ctsm. galeritum* and 44.70% for *Ctsm. osculatum*.

Table 3.2 - Tetrazolium test (TZ) results and empty testae percentages of *Catasetum* species. Values expressed as means and standard error.

Treatments	TZ	Empty testae* (%)
<i>Ctsm. complanatum</i>	44.13 ± 2.66	28.07 ± 2.24
<i>Ctsm. galeritum</i>	21.13 ± 1.56	5.73 ± 0.81
<i>Ctsm. osculatum</i>	21.95 ± 1.64	53.64 ± 11.87

*Empty testae percentages were based in the total count of seeds.

Table 3.3 - Germination average (%) of *Catasetum* in MS and MM media, with and without pretreatment and their interactions.

Species	Germination (%)
<i>Catasetum complanatum</i>	31.00a
<i>Catasetum galeritum</i>	15.37c
<i>Catasetum osculatum</i>	25.02b
F	21.58*
Culture medium	
Murashige & Skoog	22.91a
Malmgren	25.24a
F	1.43ns
Pretreatment	
With	42.25a
Without	4.75b
F	373.78*

F _{int} Species x Culture medium	0.48ns
F _{int} Species x Pretreatment	24.50*
F _{int} Culture medium x Pretreatment	9.49*
F _{int} Species x Culture medium x Pretreatment	0.56ns
C.V. (%)	23.85

Means followed by equal letters do not differ by Tukey's test at 5% probability.

*Significant at 1% probability by the F test.

Even though there is a difference between MS and MM media in not treated seeds (1.13% and 8.84%), the observed germination in pretreated seeds do not differ in both used media (Figure 3.3). The GSI supports the germination and media average, as the observed Speed Index from the pretreated seed is higher than those from the not pretreated seeds (Table 3.4).

Table 3.4 - Germination (G%) and germination speed index (GSI) of *Catasetum* species with and without pretreatment in MS and MM media. Values expressed as means and standard error.

Treatments	G%		GSI	
	Not Pre-treated	Pre-treated	Not Pre-treated	Pre-treated
<i>Ctasm. complanatum</i>	4.70 ± 1.64aB	57.31 ± 3.39aA	0.13 ± 0.05aB	1.72 ± 0.10aA
<i>Ctasm. galeritum</i>	2.87 ± 0.92aB	25.80 ± 2.08cA	0.06 ± 0.02aB	0.62 ± 0.05cA
<i>Ctasm. osculatum</i>	6.39 ± 1.78aB	43.66 ± 3.16bA	0.11 ± 0.03aB	0.87 ± 0.07bA
MS	1.13 ± 0.31bB	44.70 ± 2.52aA	0.03 ± 0.01bB	1.13 ± 0.07aA
MM	8.84 ± 1.02aB	39.81 ± 2.42aA	0.19 ± 0.02aB	1.01 ± 0.09aA

Means followed by the same letter, lowercase for column, uppercase for line, do not differ in Tukey's test at 5% probability.

Actual germination occurred from the second week of incubation, when seeds reach stage 1 of germination according to Pereira *et al.* (2011) and Zettler and Hofer (1998) in pretreated seeds of *Ctsm. galeritum*, third week in *Ctsm. complanatum* and fourth week in *Ctsm. osculatum*. After the fourth week of cultivation, it was possible to observe germinated seeds in both pretreated and not pretreated seed of *Ctsm. complanatum*, fifth week of *Ctsm. galeritum* and seventh week of *Ctsm. osculatum*. Development was followed until protocorms reached stage 3 proposed by Zettler and Hofer (1998). These results imply that regardless of the species and the culture medium, the use of preconditioning with a 10% sucrose solution for 24 hours before sowing was of great value for the germination process (Figure 3.2). The GSI corroborates these results, exhibiting higher values in pretreated seeds. Deconninck and Gerakis, (2021) presoaked *Anacamptis laxiflora* seeds with 10% sucrose solution, but for microorganism growth and increase sterilization susceptibility not for germination.

Comparing the pretreated seeds to not pretreated seeds, the observed increase in germination was 6.8 times for *Ctsm. osculatum* seeds, 9 times for *Ctsm. galeritum* up to 12,2 times for *Ctsm. complanatum*. This may be due to the osmoregulatory activity of the sucrose solution, reducing the osmotic potential and delaying the absorption of water by the seeds, avoiding damage to the embryo during hydration and activating the germination metabolism even before contact with the nutrient medium (GEORGE; HALL; KLERK, 2008; HOSOMI *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2005).

According to Manning and Staden (1987), a simple sugar exogenous source, from the culture medium, would facilitate the energy cell machinery, supplying the enzyme system in order to activate the embryo germination. The pretreatment with sucrose 10% probably initiates the energy cascade, as imbibition occurs.

Usually, culture media with amino acids as a source of nitrogen are indicated for the germination of terrestrial orchids (FIGURA *et al.*, 2020; PONERT *et al.*, 2013) and some authors suggest that seeds and protocorms assimilate nitrogen more easily from the amino acids form than from nitric nitrogen which must be converted into amino acids before plant absorption (GUPTA, 2016; KAUTH *et al.*, 2008; MAJEROWICZ *et al.*, 2000; MALMGREN, 1996). Studies with *Ctsm. fimbriatum* demonstrated its preference for ammoniacal nitrogen form over nitric form or amino acids (MAJEROWICZ *et al.*, 2000). However, the results here are promising, with no

difference in average germination rates between MM and MS medium. Comparing the usage of pretreatment, the observed germination comparison shows an increase of 4.5 times for MM and 39.5 times in MS medium, demonstrating that the use of 10% sucrose solution independent of the species was efficient.

Figure 3.2 - Germination percentage accumulated of *Catasetum complanatum* (A), *Catasetum galeritum* (B) and *Catasetum osculatum* (C) in MS and MM media, with and without pretreatment.

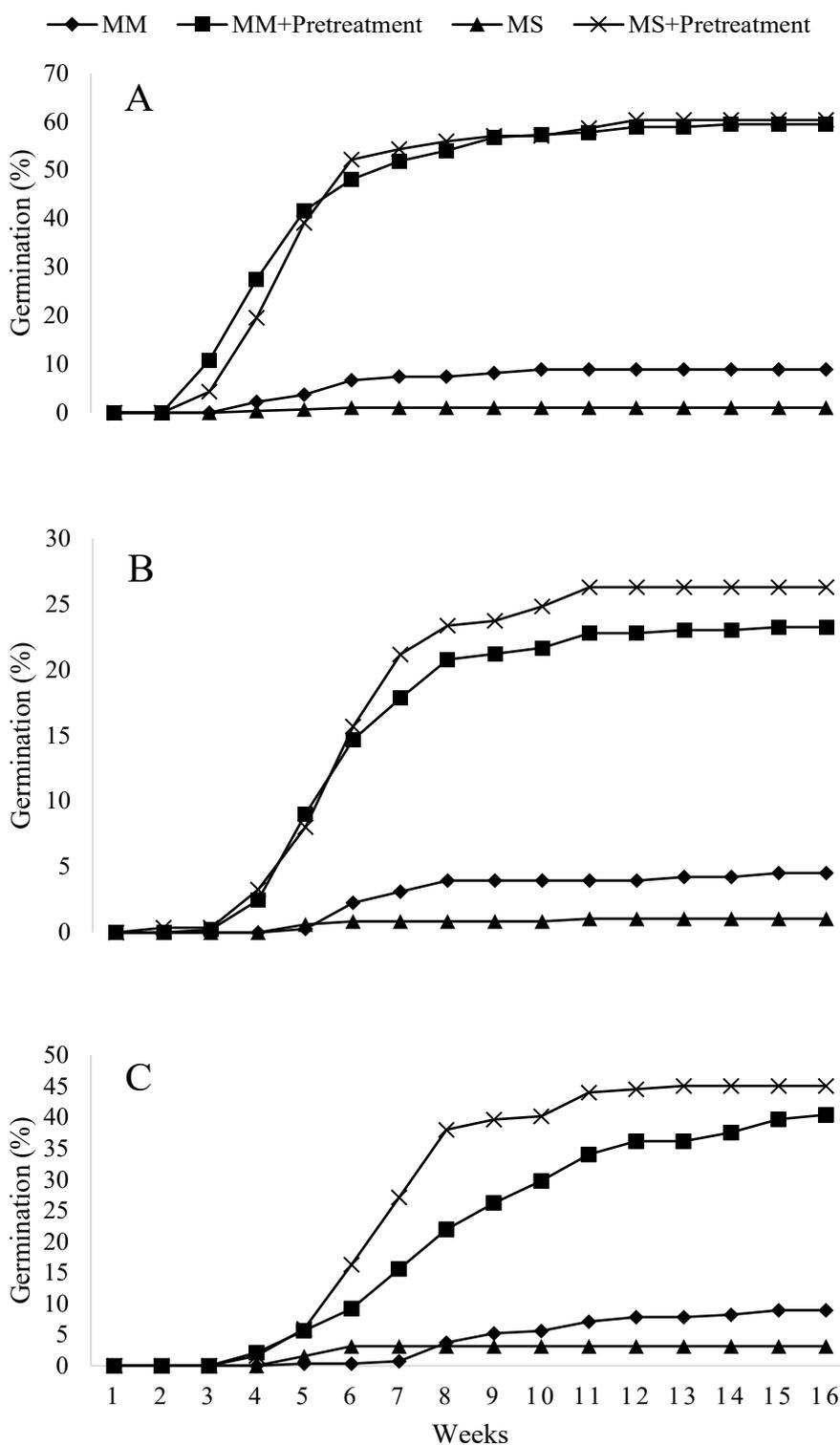
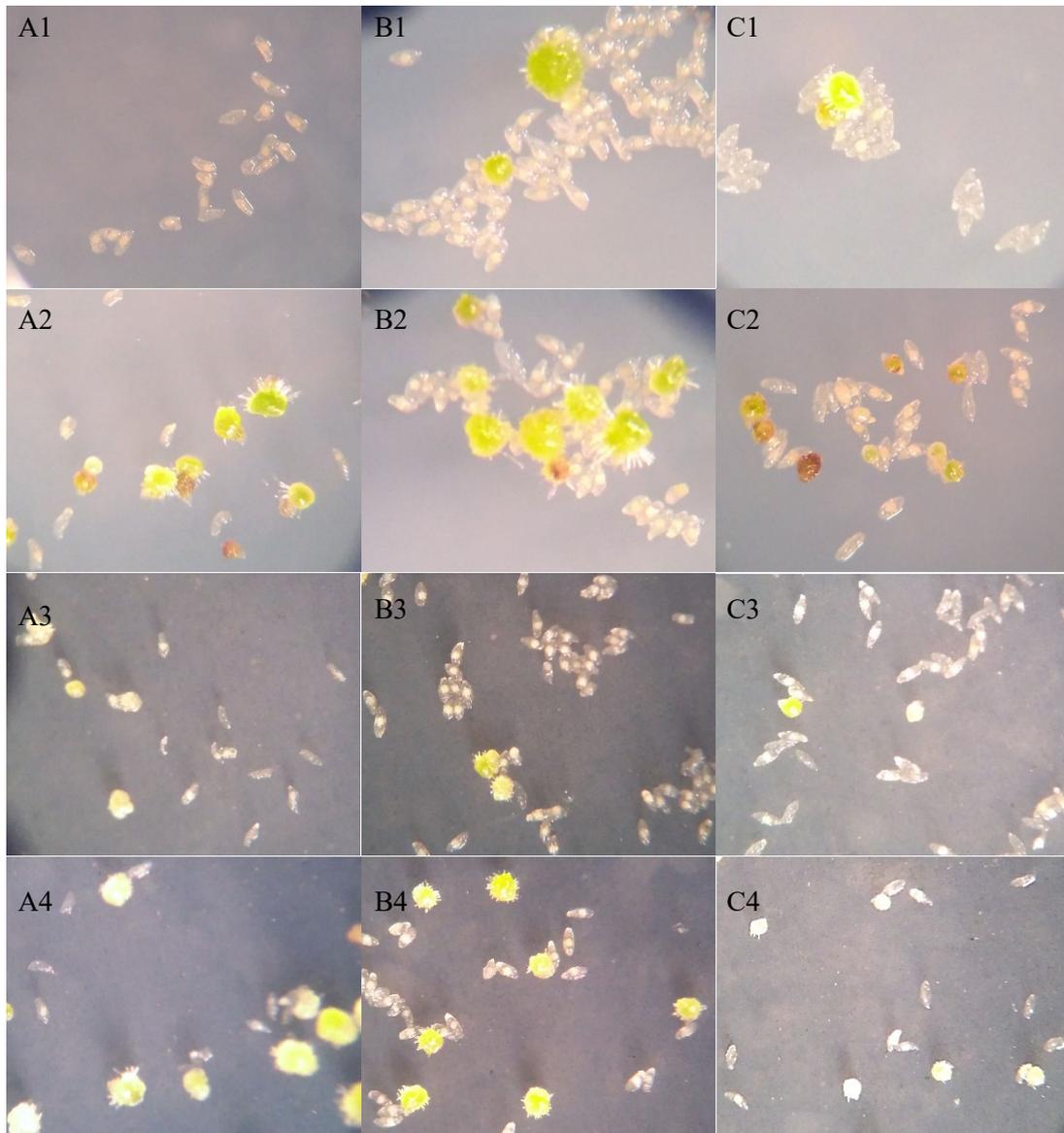


Figure 3.3 - Germination images of 12 weeks old seeds of *Catasetum complanatum* (A), *Catasetum galeritum* (B) and *Catasetum osculatum* (C), in MS media without pretreatment (1), MS media with pretreatment (2), MM media without pretreatment (3) and MM media with pretreatment (4).



Ferreira *et al.* (2018) proposed that the culture media are specific to the *Ctism. macrocarpum* development stage. The ease of having seeds and plants available to evaluate the different asymbiotic conditions increase the capacity of reintroduced species in nature (KITSAKI *et al.*, 2004).

The tetrazolium test presented inferior results than those observed in actual germination using pretreatment with 10% sucrose solution, which may indicate that despite being a good predictor of viability, the test does not substitute quantification for *in vitro* asymbiotic germination or it might need adjustments to the *Catasetum* genus.

3.4 Conclusion

The pretreatment with 10% sucrose for 24 hours, regardless of the culture medium, significantly increases the germination potential of *Catasetum complanatum*, *Ctsm. galeritum* and *Ctsm. osculatum* seeds.

References

- ARDITTI, J.; ERNST, R. Micropropagation of orchids. New York: John Wiley & Sons, 1993. 640p.
- CARDOSO, J.C.; SILVA, J.A.T.; VENDRAME, W.A. Impacts of deforestation on some orchids of São Paulo State, Brazil. *Natureza e Conservação*, v.14, n.1, p.28–32, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ncon.2016.02.001>
- DAVIÑA, J.; GRABIELE, M.; CERUTTI, J.C.; HOJSGAARD, D.; ALMADA, R.; INSAURRALDE, I.; HONFY, A. Chromosomic studies of Argentinian subtropical orchids with ornamental value in Argentina. *Agro Sur*, v.35, n.2, p.59–61, 2007. <https://doi.org/10.4206/agrosur.2007.v35n2-28>
- DECONNINCK, G.; GERAKIS, A. Influence of scarification method on seed germination of the terrestrial orchid *Anacamptis laxiflora* (Lam.). *The EuroBiotech Journal*, v.5, n.1, p.15–23, 2021. <https://doi.org/10.2478/ebtj-2021-0004>
- DIANTINA, S.; KARTIKANINGRUM, S.; MCCORMICK, A. C.; MILLNER, J.; MCGILL, C.; PRITCHARD, H. W.; NADARAJAN, J. Comparative *in vitro* seed germination and seedling development in tropical and temperate epiphytic and temperate terrestrial orchids. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v.143, n.3, p.619–633, 2020. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01947-7>

- FERREIRA, D.F. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*, v.35, n.6, p.1039–1042, 2011. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542011000600001>
- FERREIRA, W.M.; OLIVEIRA, S.P.; SUZUKI, R.M.; SILVA, K.L.F.; SOARES JÚNIOR, J.W.P. Germination, growth and morpho-anatomical development of *Catasetum macrocarpum* (Orchidaceae) *in vitro*. *Rodriguesia*, v.69, n.4, p.2137–2151, 2018. <https://doi.org/10.1590/2175-7860201869442>
- FIGURA, T.; WEISER, M.; PONERT, J. Orchid seed sensitivity to nitrate reflects habitat preferences and soil nitrate content. *Plant Biology*, v.22, n.1, p.21–29, 2020. <https://doi.org/10.1111/plb.13044>
- FILETI, J. *et al.* Seed Longevity and Cryobiotechnology in the Orchid Genus *Cattleya*. *Cryoletters*, v.42, n.6, p.356–365, 2021.
- GEORGE, E.F.; HALL, M.A.; KLERK, G.J. Plant propagation by tissue culture - Vol 1. The background. 3rd. ed. Basingstoke, UK: Springer - Dordrecht, 2008. 502p. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5005-3>
- GUPTA, A. Asymbiotic seed germination in orchids: role of organic additives. *International Advanced Research Journal in Science, Engineering and Technology*, v.3, n.5, p.143–147, 2016. <http://doi.org/10.17148/IARJSET.2016.3530>
- HENGLING, M. M. *et al.* Storage of Brazilian *Cattleya* seeds from diverse biomes: lipid composition and effects on germination. *Plant Biosystems*, v.155, n.3, p.487–497, 2020. <https://doi.org/10.1080/11263504.2020.1762781>
- HIRANO, T.; GODO, T.; MII, M.; ISHIKAWA, K. Cryopreservation of immature seeds of *Bletilla striata* by vitrification. *Plant Cell Reports*, v.23, p.534–539, 2005. <http://doi.org/10.1007/s00299-004-0893-9>
- HOSOMI, S.T.; SANTOS, R.B.; CUSTODIO, C.C.; SEATON, P.T.; MARKS, T.R.; MACHADO-NETO, N.B. Preconditioning *Cattleya* seeds to improve the efficacy of the tetrazolium test for viability. *Seed Science and Technology*, v.39, n.1, p.178–189, 2011. <http://doi.org/10.15258/sst.2011.39.1.15>
- HOSOMI, S.T.; CUSTODIO, C.C.; SEATON, P.T.; MARKS, T.R.; MACHADO-NETO, N.B. Improved assessment of viability and germination of *Cattleya* (Orchidaceae) seeds following storage. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, v.48, n.1, p.127–136, 2012. <http://doi.org/10.1007/s11627-011-9404-1>
- KAUTH, P.J.; DUTRA, D.; JOHNSON, T.R.; STEWART, S.L.; KANE, M.E., VENDRAME, W. Techniques and applications of *in vitro* orchid seed germination.

- Floriculture, ornamental and plant biotechnology: advances and topical issues*, p.375–391, 2008. https://www.researchgate.net/publication/257385365_Techniques_and_applications_of_in_vitro_orchid_seed_germination
- KITSAKI, C.K.; ZYGOURAKI, S.; ZIOBORA, M.; KINTZIOS, S. *In vitro* germination, protocorm formation and plantlet development of mature versus immature seeds from several *Ophrys* species (Orchidaceae). *Plant Cell Reports*, v.23, n.5, p.284–290, 2004. <http://doi.org/10.1007/s00299-004-0841-8>
- LI, S.H.; KUOH, C.S.; CHEN, Y.H.; CHEN, H.H.; CHEN, W.H. Osmotic sucrose enhancement of single-cell embryogenesis and transformation efficiency in *Oncidium*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v.81, n.2, p.183–192, 2005. <https://doi.org/10.1007/s11240-004-4955-z>
- MACHADO-NETO, N.B.; CUSTÓDIO, C.C. A medium for non-commercial sowing of orchid seed. *Selbyana*, v.26, p.316–317, 2005. https://www.researchgate.net/publication/262091382_A_Medium_for_Non-Commercial_Sowing_of_Orchid_Seed#:~:text=For%20home%20sowing%20of%20orchid,in%20raising%20their%20own%20orchids.
- MAGUIRE, J.D. Speed of germination - Aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Bulletin of the Japan Institute of Metals*, v.1, n.6, p.176, 1962. <https://doi.org/10.2135/cropsci1962.0011183X000200020033x>
- MAJEROWICZ, N.; KERBAUY, G.B.; NIEVOLA, C.C.; SUZUKI, R.M. Growth and nitrogen metabolism of *Catasetum fimbriatum* (Orchidaceae) grown with different nitrogen sources. *Environmental and Experimental Botany*, v.44, n.3, p.195–206, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0098-8472\(00\)00066-6](https://doi.org/10.1016/S0098-8472(00)00066-6)
- MALMGREN, S. Orchid propagation: theory and practice. In: ALLEN, C. (Ed.). *North American native terrestrial orchids: Propagation and production*. Germantown, Maryland: The North American Native Terrestrial Orchid Conference, 1996. p.131.
- MANNING, J.C.; VAN-STADEN, J. The development and mobilisation of seed reserves in some African orchids. *Australian Journal of Botany*, v.35, n.3, p.343–353, 1987. <https://doi.org/10.1071/BT9870343>
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, v.15, n.3, p.473–497, 1962. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- OLIVEIRA, J.; MORAES, M. C.; CUSTÓDIO, C. C.; MACHADO NETO, N. B. *In vitro*

- development and acclimatization of *Cyrtopodium aliciae* L. Linden & Rolfe, an endemic species of the Chapada Diamantina. *Ciencia Rural*, v.53, n.5, p.1–9, 2023. <http://doi.org/10.1590/0103-8478cr20210599>
- PEREIRA, M.C.; TORRES, D.P.; GUIMARÃES, F.A.R.; PEREIRA, O.L.; KASUYA, M.C.M. Germinação de sementes e desenvolvimento de protocormos de *Epidendrum secundum* Jacq. (Orchidaceae) em associação com fungos micorrízicos do gênero *Epulorhiza*. *Acta Botanica Brasílica*, v.25, n.3, p.534–541, 2011. <https://doi.org/10.1590/S0102-33062011000300004>
- PETINI-BENELLI, A. Nova espécie de *Catasetum* para o estado do Amazonas, Brasil. *Orquidário*, v.30, n.1–2, p.26–36, 2016. https://www.researchgate.net/publication/305766638_Nova_especie_de_Catasetum_para_o_Estado_do_Amazonas_Brasil
- PETINI-BENELLI, A. *Catasetum* in Flora e Funga do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro.2022. <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB11312>
- PONERT, J.; FIGURA, T., VOSOLSOBE, S.; LIPAVSKA, H.; VOHNIK, M.; JERSAKOVA, J. Asymbiotic germination of mature seeds and protocorm development of *Pseudorchis albida* (Orchidaceae) are inhibited by nitrates even at extremely low concentrations. *Botany*, v.91, n.10, p.662–670, 2013. <https://doi.org/10.1139/cjb-2013-0082>
- RHS. Royal Horticultural Society. Alphabetical list of standard abbreviations for natural and hybrid generic names. 2017. Available at: <https://www.rhs.org.uk/plant-registration-forms>
- SEATON, P.T.; PRITCHARD, H.W. Life in the freezer - Orchid seed banking for the future. *Orchids*, v.76, n.10, p.762–773, 2008.
- SEATON, P.T.; PRITCHARD, H.W. Orchid seed stores for sustainable use: a model for future seed-banking activities. *Lankesteriana*, v.11, n.3, p.349–353, 2011. <https://doi.org/10.15517/lank.v11i3.18290>
- SEATON, P.T.; RAMSAY, M. *Growing orchids from seed*. Royal Botanic Gardens, Kew, 2005. 88p.
- SUZUKI, R.M.; MOREIRA, V.C.; PESCADOR, R.; FERREIRA, W.M. Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of the threatened orchid *Hoffmannseggella cinnabarina*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, v.48, n.5, p.500–511, 2012. <http://doi.org/10.1007/s11627-012-9460-1>

- UTAMI, E.S.W.; HARIYANTO, S. Organic compounds: contents and their role in improving seed germination and protocorm development in orchids. *International Journal of Agronomy*, v.2020, p. 1–12, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/2795108>
- VUDALA, S.M.; RIBAS, L.L.F. Seed storage and asymbiotic germination of *Hadrolaelia graindis* (Orchidaceae). *South African Journal of Botany*, v.108, p.1–7, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sajb.2016.09.008>
- ZAKIZADEH, S.; KAVIAN, B.; HASHEMABADI, D. Micropropagation of two near threatened orchid. Part 1: *Catasetum pileatum* cv. Alba. *Advances in Horticultural Science*, v.33, n.4, p.475–483, 2019. <http://doi.org/10.13128/ahsc-8112>
- ZETTLER, L.W.; HOFER, C.J. Propagation of the little club-spur orchid (*Platanthera clavellata*) by symbiotic seed germination and its ecological implications. *Environmental and Experimental Botany*, v.39, n.3, p.189–195, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0098-8472\(97\)00019-1](https://doi.org/10.1016/S0098-8472(97)00019-1)
- ZHANG, Y., LEE, Y.I.; DENG, L. ZHAO, S. Asymbiotic germination of immature seeds and the seedling development of *Cypripedium macranthos* Sw., an endangered lady's slipper orchid. *Scientia Horticulturae*, v.164, p.130–136, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2013.08.006>

4 CAPÍTULO II - Influência da temperatura de armazenamento na germinação de sementes de *Catasetum*

Resumo

A semente de *Catasetum* é pequena, com fino tegumento recobrimdo um embrião reduzido. A semente germina após a infecção de um fungo micorrízico que fornecerá carbono para desenvolver o embrião pelos estágios iniciais do desenvolvimento da planta. A germinação assimbiótica supera a necessidade de micorrizas e permite germinar as sementes em qualquer período do ano, em grandes quantidades. Recomenda-se armazenar sementes maduras desidratadas e sob refrigeração (-20 °C). Este trabalho teve por objetivo avaliar se a temperatura de armazenamento altera as taxas de viabilidade e germinação de sementes de *Catasetum barbatum*, *Ctasm. complanatum*, *Ctasm. galeritum* e *Ctasm. fimbriatum*. A viabilidade foi averiguada por meio do teste de tetrazólio no início e com 20 meses de armazenamento, em sementes armazenadas nas temperaturas de 5 °C e -18 °C. A germinação ocorreu com uso de meio de Murashige e Skoog modificado com metade da concentração de nutrientes e foi acompanhada semanalmente. Os resultados do teste de viabilidade demonstram que houve perda significativa de viabilidade do teste inicial para o teste final aos 20 meses na temperatura de 5 °C para todas as espécies e no teste de germinação houve redução nas espécies *Ctasm. barbatum* e *Ctasm. fimbriatum*. Na temperatura de -18 °C, apenas a viabilidade de *Ctasm. complanatum* foi reduzida. O armazenamento a -18 °C foi eficiente para retardar a perda da viabilidade e manter a germinação após 20 meses para as espécies avaliadas.

Palavras-chave: Orchidaceae; meio de cultura; banco de sementes.

Abstract

Catasetum seed is small, with a thin integument covering a reduced embryo. The seed germinates after infection with a mycorrhizal fungus that will provide carbon to develop the embryo through the early stages of plant development. Asymbiotic germination overcomes the need for mycorrhiza and allows seeds to germinate at any time of the year, in large quantities. It is recommended to store mature seeds dehydrated and under refrigeration (-20 °C) at low relative humidity (circa 5% RH). Therefore, this study aimed to evaluate whether storage temperature changes the viability and germination rates of *Catasetum barbatum*, *Ctsm. complanatum*, *Ctsm. galeritum* and *Ctsm. fimbriatum* seeds. The viability was verified through the tetrazolium test at the beginning and at 20 months of storage, in seeds stored at temperatures of 5 °C and -18 °C. Germination occurred using Murashige and Skoog medium modified with half the nutrient concentration and was monitored weekly. The results of the viability test show that there was a significant loss of viability from the initial test to the ending test at 20 months at a temperature of 5 °C for all species and in the germination test there was a reduction in the species *Ctsm. barbatum* and *Ctsm. fimbriatum*. At -18 °C, only the viability of *Ctsm. complanatum* was reduced. Storage at -18 °C and at low RH was satisfactory to delay the loss of viability and maintain germination after 20 months for the assessed species.

Keywords: Orchidaceae; culture medium; seed bank.

4.1 Introdução

A semente de *Catasetum*, como de qualquer espécie de orquídea, é pequena, com fino tegumento recobrimdo um embrião reduzido contendo água e nutrientes (YAM *et al.*, 2002; YEUNG, 2017). Devido ao tamanho e a presença de poucos nutrientes de reserva, a semente germina após a infecção de um fungo micorrízico que fornecerá carbono suficiente para desenvolver o embrião pelos estágios iniciais do desenvolvimento da planta (MENG *et al.*, 2019a). A especificidade da associação fungo-espécie-fase do desenvolvimento torna a germinação simbiótica em larga escala uma metodologia pouco viável (MENG *et al.*, 2019b).

A germinação assimbiótica supera a necessidade de micorrizas e permite germinar sementes de qualquer espécie de orquídea, em qualquer período do ano e em grandes quantidades, desde que as sementes tenham sido armazenadas de modo adequado. Recomenda-se manter sementes maduras desidratadas (5% de umidade), sob refrigeração (-20 °C), dentro de frascos herméticos, podendo permanecer por anos sem perder a viabilidade (MACHADO-NETO; CUSTÓDIO, 2005; SEATON; PRITCHARD, 2011).

Em sementes de *Coffea* ssp, *Citrus* ssp e mesmo orquídeas, foi observada um comportamento intermediário causado pelo estresse da dessecação combinado com a baixa temperatura de -20 °C, especialmente em sementes ricas em triacilgliceróis (BALLESTEROS; PRITCHARD; WALTERS, 2020).

A maioria das espécies de orquídeas toleram a dessecação e podem ser mantidas na temperatura de aproximadamente -20 °C, entretanto para as espécies recalcitrantes ou de vida curta, é recomendável a manutenção das sementes em bancos de criopreservação (BALLESTEROS; PRITCHARD, 2020; COLVILLE; PRITCHARD, 2019; PENCE *et al.*, 2020; POPOVA *et al.*, 2016).

De modo geral, as condições de armazenamento pretendem minimizar a deterioração dos materiais de reserva e preservar a longevidade. Entretanto, as sementes de orquídeas são heterogêneas e essas condições só serão eficazes se forem adequadas à fisiologia das sementes (GALDIANO-JUNIOR *et al.*, 2017; MACHADO-NETO; CUSTÓDIO, 2005).

A falta de informações sobre o assunto pode interferir nos programas de conservação, e nisso incluem-se as espécies de *Catasetum* (KENDON *et al.*, 2017).

Assim, este trabalho teve por objetivo avaliar se a temperatura de armazenamento altera as taxas de viabilidade e germinação de sementes de *Catasetum*.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Sementes e armazenamento

Foram utilizadas sementes de *Catasetum barbatum* (Lindl.) Lindl., *Ctsm.*¹ *complanatum* F.E.L.Miranda & K.G.Lacerda, *Ctsm. galeritum* Rchb.f. e *Ctsm. fimbriatum* (C.Morren) Lindl., obtidas por polinização cruzada, visto que o gênero possui dimorfismo sexual, no Orquidário Bela Vista (Assis – SP, -22.67299 - 50.41754). Estas foram alocadas em envelopes de papel após deiscência, e mantidas em sílica gel por três dias em temperatura ambiente (cerca de 25 °C). Após a desidratação, foram armazenadas em frasco hermético contendo sílica gel no banco de sementes da OSSSU (SEATON; PRITCHARD, 2008) no Laboratório de Cultura de Células e Tecidos Vegetais da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE – Presidente Prudente – SP). Cada espécie foi mantida sob refrigeração nas temperaturas de -18 °C e 5 °C em atmosfera de baixa umidade relativa (5% UR), por um mínimo de 60 dias e posteriormente avaliadas em dois períodos, ao início do experimento e após 20 meses.

4.2.2 Viabilidade das sementes

A viabilidade foi averiguada por meio do teste de tetrazólio (HOSOMI *et al.*, 2011), para as sementes no início do experimento e após 20 meses de armazenamento. Cerca de 5 mg de sementes foram colocadas em microtubos e em seguida adicionado 1,0 mL de solução de sacarose 10%. Foram mantidas em temperatura ambiente por 24 horas; após esse período, o líquido foi removido, as sementes foram lavadas duas vezes com água destilada e por fim adicionou-se 1,0 mL de solução de tetrazólio 1%, permanecendo nessa solução por 24 horas em banho-maria na temperatura de 40 °C. A solução foi então removida e as sementes novamente lavadas com água destilada. As sementes já tratadas foram fotografadas

¹ Abreviação de nomes científicos de gêneros de orquídeas, seguem as regras da Royal Horticultural Society (RHS, 2017).

e contabilizadas, sendo aquelas com embrião corado tidas como viáveis e as com embrião não corado como inviáveis. Sementes vazias não foram contabilizadas. A viabilidade foi calculada com base no número de embriões viáveis pelo número total de sementes com embrião.

4.2.3 Teste de germinação

Para realizar a germinação, 5 mg de sementes foram pré-condicionadas com solução de sacarose 10% por 24 horas em temperatura ambiente. Depois foram lavadas com água destilada e então foram desinfetadas com solução de 3% de dicloroisocianurato de sódio (DCCA) com uma gota de Tween 80 por 10 minutos. Em câmara de fluxo laminar, foram lavadas duas vezes e mantidas em água até o momento da semeadura.

As sementes foram distribuídas em placas de Petri contendo meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) modificado com metade da concentração de nutrientes, acrescido de 2% de sacarose e 1% de ágar. O pH foi ajustado para 5,7 antes de autoclavar por 15 minutos a 121 °C, 1 atm. As placas foram mantidas em sala de cultivo com fotoperíodo de 16 horas de luz em uma irradiância de 35 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e temperatura de 25 ± 3 °C até a estabilização da germinação.

O Índice de Velocidade de Germinação de Maguire (1962), modificado com sucesso para orquídeas por Hosomi *et al.* (2012) por meio de leituras semanais, foi realizado seguindo a fórmula abaixo:

$$IVG = G1 / N1 + G2 / N2 + \dots + Gn / Nn$$

Sendo que G é o número de sementes germinadas por período e N é o tempo em dias após a semeadura.

A germinação foi acompanhada semanalmente com a obtenção de imagens em alta resolução por meio de câmera fotográfica acoplada a um microscópio estereoscópio. As imagens foram tratadas utilizando o software de manipulação de imagem GIMP 2.10.32. Somente embriões que romperam a testa foram aceitos como germinados.

4.2.4 Probit

De modo a averiguar a viabilidade das sementes em armazenamento a longo prazo, as porcentagens de germinação e viabilidade obtida pelo teste de

tetrazólio foram convertidas em “probits” por meio da fórmula descrita por Ellis e Roberts (1980) e apresentada por Hay (2004) como descrito a seguir:

$$v = Ki - \left(\frac{p}{\sigma}\right)$$

Onde, v é a viabilidade em probits após p dias na temperatura de armazenamento; Ki é o valor de probit teórico da viabilidade inicial e σ é o tempo observado para que a viabilidade caia um probit. O tempo para redução da viabilidade em 50%, o P_{50} , foi calculado segundo a equação:

$$P_{50} = \frac{\sigma \cdot Ki}{2}$$

Sendo que os valores observados do P_{50} permitem a comparação da longevidade entre as espécies aqui avaliadas.

4.2.5 Análise de dados

O trabalho foi feito em triplicata, totalmente casualizado, em esquema fatorial triplo com espécie x tempo de análise x temperatura de armazenamento (4 x 2 x 2). As médias de germinação e viabilidade tiveram a homogeneidade e normalidade averiguada pelos testes de Levene e Shapiro-Wilk respectivamente e, quando necessário, transformados por $\text{Arcsen } \sqrt{P\%/100}$. Na sequência os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey a 5% de probabilidade, com uso de software computacional.

4.3 Resultados

Com base nos resultados obtidos no teste de viabilidade, observou-se que houve interação entre os fatores, conseqüentemente, existe diferença na resposta das espécies dentro das temperaturas e períodos de armazenamento. *Catasetum fimbriatum* apresentou maior viabilidade ao início do experimento, com perda de viabilidade após 20 meses de armazenamento a 5 °C. Os resultados demonstram que para a espécie *Ctsm. complanatum* houve perda de viabilidade do teste inicial para o teste aos 20 meses em ambas as temperaturas (Tabela 4.1).

Foram observadas quedas mais acentuadas na viabilidade do primeiro para o segundo teste de aproximadamente 45% na temperatura de -18 °C e 72% na temperatura de 5 °C para *Ctasm. complanatum*. No caso de *Ctasm. galeritum* e *Ctasm. barbatum* a viabilidade reduziu apenas na temperatura de 5 °C.

Com relação à *Ctasm. barbatum*, o cálculo de probits dos resultados do teste de tetrazólio, para as sementes armazenada por 20 meses à -18 °C, apresenta o tempo de P₅₀ de mais de 86 anos (Tabela 4.3). Superando e muito os valores observados na mesma temperatura para as espécies *Ctasm. complanatum* e *Ctasm. galeritum*, com 4,1 e 6,5 anos. Não foi possível calcular os valores de σ e P₅₀ para *Ctasm. fimbriatum*, pois os valores efetivos de viabilidade observados ao final dos 20 meses foram superiores aos valores do início do experimento, mesmo sem diferença estatística entre eles (Tabela 4.1). Enquanto que na temperatura de 5 °C, os valores de P₅₀ variaram de 2 anos e 7 meses para *Ctasm. galeritum* até quase 6 anos em *Ctasm. fimbriatum*.

Tabela 4.1. Médias da viabilidade por teste de tetrazólio para sementes de *Catasetum* armazenadas em -18 °C e 5 °C no início e no final após 20 meses de armazenamento.

Espécie	Temperatura de armazenamento			
	-18 °C		5 °C	
	Período de armazenamento			
	Inicial	Final	Inicial	Final
<i>Catasetum barbatum</i>	57,93bA α	59,94bA α	41,71bB α	17,71bB β
<i>Catasetum complanatum</i>	83,74aA α	46,13cA β	11,16cB α	3,08cB β
<i>Catasetum fimbriatum</i>	90,01aA α	94,96aA α	94,32aA α	75,62aB β
<i>Catasetum galeritum</i>	21,97cA α	17,79dA α	10,49cB α	0,61cB β
C.V. (%)	7,07			

Médias seguidas de letras iguais, minúsculas entre espécies, maiúsculas entre temperatura de armazenamento e gregas entre período de armazenamento, não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Ao compararmos a viabilidade entre as temperaturas de 5 °C e -18 °C ao início do experimento, a queda mais acentuada ocorre com *Ctasm. complanatum*

(86%), com queda também em *Ctasm. galeritum* (52%) e *Ctasm. barbatum* (27%). Enquanto que após 20 meses de armazenamento, houveram quedas nas viabilidades em todas as espécies, sendo acima de 90% para *Ctasm. complanatum* e *Ctasm. galeritum* (Tabela 4.1).

A germinação começou a ser observada a partir da segunda semana com o rompimento da testa de alguns embriões e acompanhada até a 15ª semana quando a mesma estabilizou. O resultado dos testes estatísticos evidenciou a interação entre os três fatores.

É possível observar na Tabela 4.2 que *Ctasm. barbatum* e *Ctasm. fimbriatum* apresentaram queda na germinação das sementes armazenadas ao início e final dos 20 meses na temperatura de 5 °C. Na temperatura de -18 °C não houve diferença entre os períodos de armazenamento.

Tabela 4.2. Médias de germinação para sementes de *Catasetum* armazenadas em -18 °C e 5 °C, no início e após 20 meses de armazenamento.

Espécie	Temperatura de armazenamento			
	-18 °C		5 °C	
	Período de armazenamento			
	Inicial	Final	Inicial	Final
<i>Catasetum barbatum</i>	52,26bA α	63,01bA α	31,90bB β	7,19bB β
<i>Catasetum complanatum</i>	29,86cA α	40,69cA α	3,81cB α	1,49bB α
<i>Catasetum fimbriatum</i>	90,73aA α	95,99aA α	92,53aA α	67,58aB β
<i>Catasetum galeritum</i>	7,72dA α	16,79dA α	2,44cA α	1,20bB α
C.V. (%)	20,31			

Médias seguidas de letras iguais, minúsculas entre espécies, maiúsculas entre temperatura de armazenamento e gregas entre período de armazenamento, não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Na comparação entre as temperaturas de -18 °C e 5 °C, foi notada queda na primeira avaliação nas espécies *Ctasm. barbatum* e *Ctasm. complanatum*. Enquanto que as sementes armazenadas por 20 meses tiveram redução da germinação em todas as espécies. As reduções observadas variaram de aproximadamente 30% em *Ctasm. fimbriatum* até 96% em *Ctasm. complanatum*.

Ao se analisar as médias de germinação e as médias de viabilidade obtidas pelo teste de tetrazólio, destacamos a redução da germinação para *Ctsm. complanatum* e *Ctsm. galeritum* em ambas as temperaturas de armazenamento no teste inicial de germinação. Em *Ctsm. barbatum* houve redução discreta entre teste de viabilidade e teste de germinação apenas para as sementes armazenadas a 5 °C.

Tabela 4.3. Parâmetros das sementes de *Catasetum*, σ e P_{50} , armazenadas nas temperaturas -18 °C e 5 °C, para resultados do teste de tetrazólio (TZ) e teste de germinação (G).

Espécie	T (°C)	Teste	Ki \pm (DP)	σ (anos)	P_{50} (anos)
<i>Catasetum barbatum</i>	-18	TZ	5,22 \pm 0,03	32,88	86,30
		G	5,24 \pm 0,52	2,22	6,23
	5	TZ	4,41 \pm 0,64	1,81	4,40
		G	4,14 \pm 0,97	1,20	2,89
<i>Catasetum complanatum</i>	-18	TZ	5,47 \pm 0,85	1,36	4,13
		G	*	*	*
	5	TZ	3,36 \pm 0,58	2,00	3,78
		G	3,06 \pm 0,55	2,11	3,64
<i>Catasetum fimbriatum</i>	-18	TZ	*	*	*
		G	*	*	*
	5	TZ	6,10 \pm 0,64	1,81	5,92
		G	5,97 \pm 0,82	1,42	4,64
<i>Catasetum galeritum</i>	-18	TZ	4,30 \pm 0,41	2,83	6,50
		G	*	*	*
	5	TZ	3,27 \pm 0,85	1,37	2,65
		G	2,90 \pm 0,32	3,65	5,70

*Valores não passíveis de cálculo; dados sem declínio da germinação.

Observado os valores de P_{50} das sementes armazenadas à -18 °C e germinadas ao início e aos 20 meses, obteve-se resultado apenas para a espécie *Ctsm. barbatum*; para as demais não foi possível calcular o σ bem como o P_{50} , pois nos três casos, o valor da germinação aos 20 meses foi superior ao início do experimento. Na temperatura de 5 °C, as sementes germinadas, tem valores de P_{50}

variando de 2 anos e 10 meses em *Ctism. barbatum* até 5 anos e 8 meses em *Ctism. galeritum* (Tabela 4.3).

4.4 Discussão

A análise de variância aponta falta de homogeneidade de viabilidade entre as espécies pelo teste do tetrazólio. Sabe-se que o armazenamento de sementes maduras de orquídeas pode mantê-las viáveis por longos períodos, porém a viabilidade pode variar entre espécies, até mesmo entre cápsulas da mesma planta e diminuir com o passar do tempo (KITSAKI *et al.*, 2004; RASMUSSEN, 1995; WALTERS; BALLESTEROS; VERTUCCI, 2010).

Hengling *et al.* (2021), observaram que sementes de *Cattleya* mantidas por três meses à 11% de umidade relativa em temperaturas abaixo de 0 °C mantiveram as germinações acima de 60%. Um estudo com *Cymbidium finlaysonianum*, averiguou que sementes armazenadas na temperatura de -20 °C, mantiveram a viabilidade acima dos 80% por um ano (PUSPITANINGTYAS; HANDINI, 2020). Magrini *et al.* (2019) relataram que sementes de *Anacamptis* mantida a -24 °C com umidade de 12% mantiveram altos valores de viabilidade por mais de 4 anos. Enquanto que sementes de *Hoffmannseggella cinnabarina*, conservadas por 360 dias a 4 °C tiveram uma redução de 45,3% de viabilidade aos 180 dias para 5% ao final do experimento (SUZUKI *et al.*, 2012).

As espécies aqui estudadas se comportam como esperado, com redução da viabilidade e germinação quando mantidas em temperatura de 5 °C se comparadas com as mantidas em -18 °C. A tendência observada após 20 meses em *Ctism. complanatum* de perda de mais de 90% de viabilidade e germinação comparando-se a temperatura de -18 °C com 5 °C pode indicar que estas sejam sementes do tipo ortodoxas de vida curta (MACHADO-NETO; CUSTÓDIO, 2005).

Outro ponto a ser enfatizado é a baixa germinação de *Ctism. complanatum* e *Ctism. galeritum*. A viabilidade apontada para a primeira, pelo teste de tetrazólio, foi de 83,74% para sementes armazenadas a -18 °C com germinação efetiva de 29,86% e viabilidade de 11,16% para 5 °C com germinação de 3,81%, o que computa como uma redução de 64,3 e 68,8% respectivamente. Enquanto que *Ctism. galeritum*, teve uma redução de 64,8% entre viabilidade e germinação nas sementes a -18 °C e 76,7% nas sementes a 5 °C. Uma das causas para tal redução pode ser a

dormência secundária induzida por baixas temperaturas (GENEVE, 2003). Conforme Franceschi *et al.* (2019) relataram, sementes de orquídeas podem ser ortodoxas de vida curta, o que promoveria a redução da germinação após dissecação e armazenamento em baixas temperaturas como nos casos de *Grandiphyllum* e *Gomesa*. Outros autores obtiveram dados semelhantes com os aqui expostos (HAY *et al.*, 2010; MERRITT *et al.*, 2014).

É possível que a baixa temperatura tenha promovido a degradação das reservas lipídicas presentes nos embriões de *Ctsm. complanatum* e *Ctsm. galeritum*. Caso as sementes possuam elevadas proporções de ácidos graxos insaturados, pode ter ocorrido peroxidação das reservas e esses danos oxidativos são capazes de inviabilizar a germinação (COLVILLE *et al.*, 2015). Análises acerca das reservas de lipídios dessas espécies são necessárias para determinar a metodologia de armazenamento mais adequada para cada grupo.

A composição do meio de cultura pode também afetar a porcentagem de germinação, visto que os componentes do meio de cultura quando incompletos, não substituem adequadamente o fungo micorrízico para a germinação (KANG *et al.*, 2020; RASMUSSEN, 1992). Moraes *et al.* (2020) observaram que o uso de meio de cultura simplificado à base de fertilizante comercial acrescido de aditivos orgânicos, proporcionou melhor germinação e desenvolvimento de *Ctsm. fimbriatum* e *Ctsm. macrocarpum* em relação ao meio MS/2. Enquanto que Majerowicz *et al.* (2000) sugerem que o uso de nitrogênio orgânico (glutamina) e íons de nitrogênio NH_4^+ são as principais fontes de nitrogênio que promoveram o crescimento de *Ctsm. fimbriatum*. Não obstante, Ferreira *et al.* (2018), notaram que a germinação de *Ctsm. macrocarpum* no meio Knudson C se mostrou mais eficiente, com meio Vacin-Went promovendo melhor desenvolvimento de protocormos e meio $\frac{1}{2}\text{MS}$ para multiplicação e crescimento.

As análises de probit e P_{50} apontam resultados de tempo superiores aos encontrados por Hengling *et al.* (2021). Os dados com sementes de *Cattleya* são respectivos a períodos de tempo mais curtos, de em média 1 ano, excetuando-se *C. rupestris* que, armazenada na temperatura de $-18\text{ }^\circ\text{C}$, teve seu P_{50} observado de 3 anos. Contudo, no trabalho de Hosomi (2016), também sobre espécies do gênero *Cattleya*, são mostrados valores de P_{50} variando de 4,5 anos para um período de armazenamento de 36 meses até 263,8 anos para sementes armazenadas por 87 meses.

Já no trabalho de Hay *et al.* (2010), as condições de armazenamento das sementes (60% de umidade relativa e 40 °C) promoveram o envelhecimento acelerado das sementes, fazendo com que o P_{50} fosse de pouco mais de um mês, muito abaixo de outras espécies que não são orquídeas (SEATON *et al.*, 2018).

As evidências aqui observadas, enfatizam a necessidade de gerar mais dados sobre a longevidade das sementes de orquídeas, advertindo sobre o uso de um protocolo único para Orchidaceae, pois os comportamentos podem diferir entre os gêneros e as espécies.

4.5 Conclusão

O comportamento de *Ctsm. complanatum* e *Ctsm. galeritum* pode ter sido influenciado pelo meio de cultura para germinação, pela dessecação ou pela baixa temperatura de armazenamento.

O armazenamento a -18 °C foi eficiente para retardar a perda de viabilidade e manter a germinação ao longo de 20 quando comparado ao armazenamento a 5 °C em todas as espécies, contudo, principalmente, para *Ctsm. barbatum* e *Ctsm. fimbriatum*.

A temperatura de 5 °C não é indicada, pois pode reduzir drasticamente a viabilidade.

Referências

- BALLESTEROS, D.; PRITCHARD, H. W. The cryobiotechnology of oaks: An integration of approaches for the long-term *ex-situ* conservation of *Quercus* species. **Forests**, v.11, n.12, p.1–23, 2020.
- BALLESTEROS, D.; PRITCHARD, H. W.; WALTERS, C. Dry architecture: towards the understanding of the variation of longevity in desiccation-tolerant germplasm. **Seed Science Research**, v.30, n.2, p.142–155, 2020.
- COLVILLE, L. *et al.* Development of a reliable GC-MS method for fatty acid profiling using direct transesterification of minimal quantities of microscopic orchid seeds. **Seed Science Research**, v.26, n.1, p.84–91, 2015.

- COLVILLE, L.; PRITCHARD, H. W. Seed life span and food security. **New Phytologist**, v.224, n.2, p.557–562, 2019.
- ELLIS, R. H.; ROBERTS, E. H. Improved equations for the prediction of seed longevity. **Annals of Botany**, v.45, n.1, p.13–30, 1980.
- FERREIRA, W. DE M. *et al.* Germinação, crescimento e desenvolvimento morfoanatômico de *Catasetum macrocarpum* (Orchidaceae) *in vitro*. **Rodriguesia**, v.69, n.4, p.2137–2151, 2018.
- FRANCESCHI, C. R. B. *et al.* Storage and *in vitro* germination of orchids (Orchidaceae) seeds from Atlantic Forest – Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v 91, n.3, p.1–11, 2019.
- GALDIANO-JUNIOR, R. F. *et al.* Seed cryopreservation, *in vitro* propagation and *ex vitro* growth of *Cattleya walkeriana* Gardner, a vulnerable ornamental orchid. **Australian Journal of Crop Science**, v.11, n.4, p.485–490, 2017.
- GENEVE, R. L. Impact of temperature on seed dormancy. **HortScience**, v.38, n.3, p.336–341, 2003.
- HAY, F. **The seed viability equations: the normal distribution and probits**. Disponível em: <https://data.kew.org/sid/viability/SeedViabilityEquationsFHDec04.pdf>. Acesso em: 10 maio 2022.
- HAY, F. R. *et al.* Comparative longevity of Australian orchid (Orchidaceae) seeds under experimental and low temperature storage conditions. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.164, n.1, p.26–41, 2010.
- HENGLING, M. M. *et al.* Storage of Brazilian *Cattleya* seeds from diverse biomes: lipid composition and effects on germination. **Plant Biosystems**, v.155, n.3, p.487–497, 2021.
- HOSOMI, S. T. *et al.* Preconditioning *Cattleya* seeds to improve the efficacy of the tetrazolium test for viability. **Seed Science and Technology**, v.39, n.1, p.178–189, 2011.
- HOSOMI, S. T. *et al.* Improved assessment of viability and germination of *Cattleya* (Orchidaceae) seeds following storage. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v.48, n.1, p.127–136, 2012.
- HOSOMI, S. T. **Sementes de orquídeas: conservação e avaliação de viabilidade**. 2016. Tese (Doutor em Agronomia) - Universidade do Oeste Paulista, 2016.
- KANG, H. *et al.* *In vitro* propagation of *Gastrochilus matsuran* (Makino) Schltr., an endangered epiphytic orchid. **Plants**, v.9, p.524–534, 2020.

- KENDON, J. P. *et al.* Collecting near mature and immature orchid seeds for *ex-situ* conservation: 'in vitro collecting' as a case study. **Botanical Studies**, v.58, n.1, p.34, 2017.
- KITSAKI, C. K. *et al.* *In vitro* germination, protocorm formation and plantlet development of mature versus immature seeds from several *Ophrys* species (Orchidaceae). **Plant Cell Reports**, v.23, n.5, p.284–290, 2004.
- MACHADO-NETO, N. B.; CUSTÓDIO, C. C. Orchid Conservation through seed banking: Ins and Outs. **Selbyana**, v.25, n.2, p.229–235, 2005.
- MAGRINI, S. *et al.* Seed banking of terrestrial orchids: evaluation of seed quality in *Anacamptis* following 4-year dry storage. **Plant Biology**, v.21, n.3, p.544–550, 2019.
- MAGUIRE, J. D. Speed of germination - aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Bulletin of the Japan Institute of Metals**, v.1, n.6, p.176, 1962.
- MAJEROWICZ, N. *et al.* Growth and nitrogen metabolism of *Catasetum fimbriatum* (Orchidaceae) grown with different nitrogen sources. **Environmental and Experimental Botany**, v.44, n.3, p.195–206, 2000.
- MENG, Y. Y. *et al.* Symbiotic fungi undergo a taxonomic and functional bottleneck during orchid seeds germination: a case study on *Dendrobium moniliforme*. **Symbiosis**, v.79, n.3, p.205–212, 2019a.
- MENG, Y. Y. *et al.* Are fungi from adult orchid roots the best symbionts at germination? A case study. **Mycorrhiza**, v.29, n.5, p.541–547, 2019b.
- MERRITT, D. J. *et al.* *Ex-situ* conservation and cryopreservation of orchid germplasm. *International Journal of Plant Sciences*, v.175, n.1, p.46–58, 2014.
- MORAES, M. C. *et al.* Commercial fertilizers and organic additives in orchid micropropagation. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v.16, p.e162, 2020.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A Revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, n.3, p.473–497, jul. 1962.
- PENCE, V. C. *et al.* Cryobiotechnologies: Tools for expanding long-term *ex-situ* conservation to all plant species. **Biological Conservation**, v.250, n.Sept, p.108736, 2020.
- POPOVA, E. *et al.* Frozen beauty: the cryobiotechnology of orchid diversity. **Biotechnology Advances**, v.34, n.4, p.380–403, 2016.

- PUSPITANINGTYAS, D. M.; HANDINI, E. *Ex-situ* conservation of *Cymbidium finlaysonianum* by seed storage. **Biodiversitas**, v.21, n.8, p.3519–3524, 2020.
- RASMUSSEN, H. N. Seed dormancy patterns in *Epipactis palustris* (Orchidaceae): Requirements for germination and establishment of mycorrhiza. **Physiologia Plantarum**, v.86, n.1, p.161–167, 1992.
- RASMUSSEN, H. N. **Terrestrial orchids: from seed to mycotrophic plant**. New York, USA: Cambridge University Press, 1995.
- RHS, R. H. S. **Alphabetical List of Standard Abbreviations For Natural and Hybrid Generic Names**. 2017.
- SEATON, P. T. *et al.* Orchid seed and pollen: a toolkit for long-term storage, viability assessment and conservation. *In*: LEE, Y. I.; YEUNG, E. C. (Eds.). **Orchid Propagation: From Laboratories to Greenhouses— Methods and Protocols**. New York, USA: Humana Press, 2018.
- SEATON, P. T.; PRITCHARD, H. W. Life in the freezer - Orchid seed banking for the future. **Orchids**, v. 77, n. 10, p. 762–773, 2008.
- SEATON, P. T.; PRITCHARD, H. W. Orchid seed stores for sustainable use: a model for future seed-banking activities. **Lankesteriana**, v.11, n.3, p.349–353, 2011.
- SUZUKI, R. M. *et al.* Asymbiotic seed germination and in vitro seedling development of the threatened orchid *Hoffmannseggella cinnabarina*. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v.48, n.5, p.500–511, 2012.
- WALTERS, C.; BALLESTEROS, D.; VERTUCCI, V. A. Structural mechanics of seed deterioration: Standing the test of time. **Plant Science**, v.179, n.6, p.565–573, 2010.
- YAM, T. W. *et al.* Embryology-seeds. *In*: KULL, T.; ARDITTI, J. (Eds.). **Orchid Biology: Reviews and Perspectives, VIII**. 2002. p.288–377.
- YEUNG, E. C. A perspective on orchid seed and protocorm development. **Botanical Studies**, v.58, n.33, p.1–14, 2017.

5 CAPÍTULO III - Reservas lipídicas de sementes de *Catasetum* (Orchidaceae)

Resumo

Inúmeras espécies de plantas vêm sendo preservadas em bancos de sementes, incluindo as orquídeas. No entanto, as condições de temperatura, umidade e gases atmosféricos podem interferir na oxidação dos ácidos graxos, reduzindo vigor, viabilidade e conseqüentemente a porcentagem de germinação das sementes. Sabendo que as sementes de orquídeas armazenam grandes quantidades de lipídios, este pode ser um fator determinante para a perda de viabilidade de algumas espécies de orquídeas armazenadas em baixas temperaturas. Este trabalho teve por objetivo caracterizar o perfil lipídico de diferentes espécies do gênero *Catasetum*. A determinação dos ácidos graxos das sementes foi baseada em transesterificação e a análise realizada com cromatografia gasosa. Foram analisadas as porcentagens de ácidos graxos saturados (AGS), insaturados (AGI), monoinsaturados (AGM), poli-insaturados (AGP), as proporções de insaturados por saturados (I/S), monoinsaturados por saturados (M/S), poli-insaturados por saturados (P/S) e monoinsaturados por poli-insaturados (M/P). Estes foram submetidos ao índice de ligação dupla (ILD) e índice de peroxidação (IP). Os dados aqui obtidos também apresentam variação entre os acessos de *Catasetum*. Os valores mais elevados de IP e ILD em *Catasetum gladiatorium* sugerem que esta espécie está mais suscetível à dano oxidativo, juntamente com outros acessos com valores também elevados, implicando em deterioração durante o armazenamento. Os valores de AGI mais elevados que AGS na maioria das espécies, levam a crer que a baixa temperatura não é o fator crítico no armazenamento de *Catasetum*, o que pode contribuir para longevidade das sementes.

Palavras-chave: Ácidos graxos, armazenamento, peroxidação, cromatografia gasosa.

Abstract

Numerous plant species have been preserved in seed banks, including orchids. However, the conditions of temperature, humidity and atmospheric gases can

interfere in the oxidation of fatty acids, reducing vigor, viability and consequently the germination percentage of the seeds. Knowing that orchid seeds store large amounts of lipids, this may be a determining factor for the loss of viability of some orchid species stored at low temperatures. This work aimed to characterize the lipid profile of different species of the genus *Catasetum*. The determination of the fatty acids of the seeds was based on transesterification and the analysis was carried out with gas chromatography. The percentages of saturated (SGA), unsaturated (AGI), monounsaturated (AGM), polyunsaturated (AGP) fatty acids, the proportions of unsaturated to saturated (I/S), monounsaturated to saturated (M/S), polyunsaturated by saturated (P/S) and monounsaturated by polyunsaturated (M/P). These were subjected to the double bond index (DLI) and peroxidation index (IP). The data obtained here also show variation among *Catasetum* accessions. The higher IP and ILD values in *Catasetum gladiatorium* suggest that this species is more susceptible to oxidative damage, together with other accessions with high values, implying deterioration during storage. The higher AGI values than AGS in most species lead to the belief that low temperature is not the critical factor in *Catasetum* storage, which may contribute to seed longevity. Due to the susceptibility of AGI to oxidation, it would be necessary to add antioxidants to minimize this process.

Keywords: Fatty acids, storage, peroxidation, gas chromatography.

5.1 Introdução

Sementes de orquídeas vem sendo estudadas desde os anos 1840, quando da aplicação da primeira metodologia de germinação por David Moore (ARDITTI, 1984). Desde então, diversos estudos estão voltados à germinação simbiótica e assimbiótica, no entanto, as necessidade de conservação levaram a “International Orchid Commission” a sugerir a criação de uma rede internacional de bancos de orquídeas, que levou à criação da rede global “Orchid Seed Stores for Sustainable Use” (OSSSU) como parte do “Darwin Initiative Project” (SEATON; PRITCHARD, 2008).

Inúmeras espécies vêm sendo preservadas em bancos de sementes por décadas (ROOS; DAVIDSON, 1992). Mas, descobertas sugerem que o

comportamento dos materiais de reserva de sementes, como as reservas lipídicas, pode ser alterado caso as condições não sejam adequadas (MIRA *et al.*, 2019). As condições de temperatura, umidade e gases atmosféricos podem interferir na oxidação dos ácidos graxos, reduzindo vigor, viabilidade e conseqüentemente a porcentagem de germinação das sementes (DOLATABADIAN; ALI; MODARRES, 2008).

Sabe-se que as sementes de orquídeas armazenam grandes quantidades de lipídios no lugar de carboidratos (HENGLING *et al.*, 2021a; MANNING; STADEN, 1987; RASMUSSEN, 1990; RICHARDSON; PETERSON; CURRAH, 1992). Este pode ser um fator determinante para a perda de viabilidade de algumas espécies de orquídeas armazenadas em baixas temperaturas. Isto posto, o objetivo desse trabalho foi obter conhecimento do perfil lipídico de espécies do gênero *Catasetum* de modo a aprimorar as técnicas de preservação *ex-situ* em bancos de sementes.

5.2 Material e métodos

5.2.1 Sementes e armazenamento

Sementes de *Catasetum* foram obtidas por polinização cruzada (Tabela 5.1). Após a coleta, foram mantidas em envelopes de papel sobre uma camada de sílica gel em temperatura ambiente por um mínimo de três dias e posteriormente armazenadas sob refrigeração a -18 °C no banco de sementes de orquídeas da OSSSU (Orchid Seed Science and Sustainable Use), no Laboratório de Cultura de Células e Tecidos Vegetais da Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente – SP, seguindo o protocolo de Seaton e Pritchard (2008).

Tabela 5.1 Espécies de *Catasetum*, doador, locais de ocorrência e situação de conservação.

Espécie (acesso)	Doador	Ocorrência ¹	Conservação ¹
<i>Ctasm.</i> ² <i>barbatum</i> (1)	Bela Vista Orchids	AM, PA, RR, TO, AL, BA, CE, MA,	NE ³
<i>Ctasm.</i> <i>barbatum</i> (2)	Orquidário Rio Preto	PB, PE, PI, DF, GO, MS, MT, MG	
<i>Ctasm.</i> <i>ciliatum</i>	Bela Vista Orchids	AM, AP, PA, RO, RR, MA	NE
<i>Ctasm.</i> <i>complanatum</i> (1)	Bela Vista Orchids		
<i>Ctasm.</i> <i>complanatum</i> (2)	Valdison Catasetinae	RO, MT	NE
<i>Ctasm.</i> <i>complanatum</i> (3)	Valdison Catasetinae		
<i>Ctasm.</i> <i>complanatum</i> (4)	Valdison Catasetinae		
<i>Ctasm.</i> <i>denticulatum</i> (1)	Valdison Catasetinae	RO	NE
<i>Ctasm.</i> <i>denticulatum</i> (2)	Valdison Catasetinae		
<i>Ctasm.</i> <i>fimbriatum</i> (1)	Orquidário Aurora Propriedade		
<i>Ctasm.</i> <i>fimbriatum</i> (2)	Particular Álvares Machado Propriedade		
<i>Ctasm.</i> <i>fimbriatum</i> (3)	Particular Presidente Prudente	PA, RR, DF, GO, MS, MT, MG, SP,	LC
<i>Ctasm.</i> <i>fimbriatum</i> (4)	Parque Estadual Morro do Diabo	PR, RS, SC	
<i>Ctasm.</i> <i>fimbriatum</i> (5)	Parque Estadual Morro do Diabo		
<i>Ctasm.</i> <i>fimbriatum</i> (6)	Orquidário Rio Preto		
<i>Ctasm.</i> <i>fimbriatum</i> (7)	Valdison Catasetinae		
<i>Ctasm.</i> <i>galeritum</i>	Bela Vista Orchids	AM, PA, TO, MA, MT	NE

¹ Flora e Funga do Brasil (PETINI-BENELLI, 2022).

² Abreviação de nomes científicos de gêneros de orquídeas, seguem as regras da Royal Horticultural Society (RHS, 2017).

³ NE – Não avaliado; LC – Pouco preocupante.

<i>Ctasm. gladiatorium</i>	Bela Vista Orchids	GO, MT	NE
<i>Ctasm. juruenense</i>	Valdison Catasetinae	AC, PA, RO, MT	NE
<i>Ctasm. longifolium</i> (1)	Valdison Catasetinae	AM, AP, PA, RO,	NE
<i>Ctasm. longifolium</i> (2)	Valdison Catasetinae	RR, MS, MT	
<i>Ctasm. osculatum</i> (1)	Bela Vista Orchids		NE
<i>Ctasm. osculatum</i> (2)	Valdison Catasetinae	PA, RO, MS, MT	
<i>Ctasm. osculatum</i> (3)	Orquidário Aurora		
<i>Ctasm. pulchrum</i>	Valdison Catasetinae	AM, PA, RO, MT	NE
<i>Ctasm. semicirculatum</i> (1)	Bela Vista Orchids		NE
<i>Ctasm. semicirculatum</i> (2)	Valdison Catasetinae	AC, AM, RO	NE

5.2.2 Determinação de ácidos graxos

A determinação dos ácidos graxos das sementes foi baseada em transesterificação (COLVILLE *et al.*, 2015). Amostras de cada acesso foram separadas em lotes de 10 mg. Cada amostra foi colocada em frascos de vidro de 20 mL com 1 mL de tolueno ($\geq 99,5\%$) contendo 50 mg/L do antioxidante hidroxitolueno butilado (BHT). As amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 4 horas. Os ácidos graxos foram metilados com 2 mL de ácido sulfúrico 1% em metanol (v/v) *overnight* a 50 °C. Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram isolados por particionamento com 5 mL de hexano e 5 mL de NaCl 5% (p/v). A fase orgânica foi transferida para um frasco limpo e a fase aquosa foi lavada com mais 5 mL de hexano ($\geq 99\%$). A remoção da fase orgânica foi realizada de modo a evitar a aspiração das sementes. As fases orgânicas foram combinadas e então secas a 45 °C com auxílio de ventilação forçada. A porção residual foi dissolvida em 1 mL de hexano e sequencialmente transferida em frascos de 2 mL para a análise com cromatografia gasosa.

Os ésteres metílicos de ácidos graxos (EMAG) foram separados por cromatografia gasosa em cromatógrafo Varian 3800 com detector FID (Detector por ionização de chama) em coluna capilar com 60 metros, 0,25 μm de diâmetro interno e espessura de filme de 0,20 μm . O gás de arraste utilizado foi o hidrogênio com fluxo de 0,6 mL por minuto. A programação utilizada foi descrita por Hengling *et al.* (2021). O volume injetado foi de 2 μL do EMAG extraídos e os componentes foram

identificados por comparação com padrões analíticos e analisados no software Star Chromatography Workstation.

5.2.3 Análise dos dados

Os dados da avaliação das reservas lipídicas foram tabulados e comparadas às porcentagens de ácidos graxos saturados (AGS), insaturados (AGI), monoinsaturados (AGM), poli-insaturados (AGP), às proporções de insaturados por saturados (I/S), monoinsaturados por saturados (M/S), poli-insaturados por saturados (P/S) e monoinsaturados por poli-insaturados (M/P). Estes foram submetidos ao índice de ligação dupla (ILD) e índice de peroxidação (IP) com as equações descritas por Pamplona *et al.* (1998).

Foram construídas duas matrizes de similaridade (uma para os valores de IP e ILD e outra para os valores de AGS, AGI, AGM e AGP) baseada na distância euclidiana, estimando-se a correlação cofenética. Os acessos foram agrupados pelo método UPGMA e o dendrograma foi gerado com auxílio do software Past versão 4.03.

5.3 Resultados

As composições lipídicas dos 27 acessos aqui estudados variam em tipos de lipídios e quantidades (Tabela 5.2). Alguns ácidos graxos são comuns a todos os acessos como ácido esteárico (C18:0) e ácido palmitoleico (C16:1n-7). Os ácidos araquídico (C20:0), oleico (C18:1n-9), linoleico (C18:2n-6) e gama linolênico (C18:3n-6) foram observados na maioria dos acessos.

Observou-se ocorrências únicas como o ácido behênico (C22:0) encontrado apenas em *Ctasm. galeritum*, ácido erúcico (C22:1n-9) em *Ctasm. fimbriatum* (6), ácido cis-13,16-docosadienoico (C22:2n-6) em *Ctasm. barbatum* (2) e ácido di-homo-gama-linolênico (C20:3n-6) em *Ctasm. fimbriatum* (5).

Os ácidos com maiores porcentagens foram o gama linolênico (C18:3n-6) sendo 73,65% em *Ctasm. osculatum* (1) e ácido gadoleico (C20:1n-11), com 74,94% para *Ctasm. osculatum* (2).

O acesso *Ctsm. barbatum* (2) possui a maior diversidade de ácidos graxos, com 11 tipos, enquanto que os acessos *Ctsm. longifolium* (2) e *Ctsm. osculatum* (1) tem apenas 5. Os demais apresentam uma média de sete tipos de ácidos graxos.

Em todos os casos a quantidade de AGI é maior que de AGS (Tabela 5.3). Em *Ctsm. barbatum* (2) as proporções de I/S e P/S são maiores, sendo a espécie com menores quantidades de AGS em comparação aos demais. Nas relações de M/S observamos os valores mais elevados em *Ctsm. fimbriatum* (5). As proporções de M/P estão baixíssimas na maioria das espécies, excetuando-se *Ctsm. pulchrum* (11,45), *Ctsm. juruenense* (16,70) e *Ctsm. osculatum* (2) (28,49).

Ao observarmos os índices de peroxidação, destacamos *Ctsm. gladiatorium*, com o maior valor observado, enquanto que *Ctsm. osculatum* (2) e *Ctsm. fimbriatum* (2) apresentam valores muito inferiores, cerca de 32 vezes menores que o primeiro. Os índices de dupla ligação acompanham de maneira semelhante a variação do IP, ou seja, valores baixos de IP seguem valores mais baixos de IDL.

Sobre as matrizes de similaridade, a correlação cofenética observada foi de 0,97 para ambas as análises, indicando elevada associação linear. Com base nos dendrogramas gerados pelo método UPGMA, podemos observar dois agrupamentos. No menor deles encontramos *Ctsm. fimbriatum* (5), *Ctsm. juruenense*, *Ctsm. fimbriatum* (2), *Ctsm. osculatum* (2), *Ctsm. pulchrum* e *Ctsm. semicirculatum* (1) (Figuras 5.1 e 5.2). Os demais acessos estão no agrupamento maior que na Figura 5.1 observamos uma subdivisão em outros 2 grupos.

Tabela 5.2. Composição lipídica (em porcentagem) de espécies de *Catasetum*.

	<i>Ctsm.</i> <i>barbatum</i> (1)	<i>Ctsm.</i> <i>barbatum</i> (2)	<i>Ctsm.</i> <i>ciliatum</i>	<i>Ctsm.</i> <i>complanatum</i> (1)	<i>Ctsm.</i> <i>complanatum</i> (2)	<i>Ctsm.</i> <i>complanatum</i> (3)	<i>Ctsm.</i> <i>complanatum</i> (4)
Ácido graxo							
C16:0 ^a	-	-	-	-	-	2,25	-
C18:0	22,92	7,43	9,89	16,83	16,09	15,43	16,4
C20:0	8,77	2,99	7,38	8,87	9,56	6,89	7,62
C22:0	-	-	-	-	-	-	-
C24:0	4,96	0,99	-	-	-	-	-
C16:1n-7	4,08	1,41	4,37	6,75	4,55	3,92	6,41
C18:1n-9	-	6,31	2,89	2,86	3,17	1,61	1,6
C20:1n-11	-	-	-	-	-	-	-
C22:1n-9	-	-	-	-	-	-	-
C24:1n-9	2,41	1,73	-	-	-	-	-
C18:2n-6	-	1,61	3,72	10,21	5,74	1,69	5,06
C20:2n-6	-	4,23	-	-	-	-	-
C22:2n-6	-	1,65	-	-	-	-	-
C18:3n-6	49,32	29,74	71,76	54,48	60,89	68,21	59,43
C18:3n-3	7,54	41,90	-	-	-	-	6,47
C20:3n-6	-	-	-	-	-	-	-

^aNúmero de carbonos: insaturação e posição.

Tabela 5.2 Cont.

	<i>Ctsm.</i> <i>fimbriatum</i> (6)	<i>Ctsm.</i> <i>fimbriatum</i> (7)	<i>Ctsm.</i> <i>galeritum</i>	<i>Ctsm.</i> <i>gladiatorium</i>	<i>Ctsm.</i> <i>juruenense</i>	<i>Ctsm.</i> <i>longifolium</i> (1)	<i>Ctsm.</i> <i>longifolium</i> (2)
Ácido graxo							
C16:0	1,34	1,01	-	-	-	-	-
C18:0	14,83	13,12	13,3	12,29	14,85	16,69	16,4
C20:0	8,92	8,90	7,86	-	6,91	10,60	10,81
C22:0	-	-	3,75	-	-	-	-
C24:0	3,42	-	3,99	1,37	0,97	3,86	-
C16:1n-7	3,79	2,77	3,26	2,23	2,84	5,05	6,99
C18:1n-9	2,90	2,52	1,42	1,91	7,15	9,17	-
C20:1n-11	-	-	-	-	62,92	-	-
C22:1n-9	1,20	-	-	-	-	-	-
C24:1n-9	1,20	-	-	-	-	-	-
C18:2n-6	6,02	2,30	3,38	9,81	4,37	4,68	18,69
C20:2n-6	-	-	5,37	-	-	-	-
C22:2n-6	-	-	-	-	-	-	-
C18:3n-6	58,93	69,38	52,23	72,39	-	46,26	47,11
C18:3n-3	-	-	5,71	-	-	6,69	-
C20:3n-6	-	-	-	-	-	-	-

Tabela 5.2 Cont.

	<i>Ctsm.</i> <i>osculatum</i> (1)	<i>Ctsm.</i> <i>osculatum</i> (2)	<i>Ctsm.</i> <i>osculatum</i> (3)	<i>Ctsm.</i> <i>pulchrum</i>	<i>Ctsm.</i> <i>semicirculatum</i> (1)	<i>Ctsm.</i> <i>semicirculatum</i> (2)
Ácido graxo						
C16:0	-	-	-	-	-	-
C18:0	14,93	12,17	12,57	17,59	15,98	13,32
C20:0	-	6,51	8,10	5,14	-	6,89
C22:0	-	-	-	-	-	-
C24:0	-	-	-	2,70	1,84	7,07
C16:1n-7	4,06	1,85	2,67	3,31	2,90	2,89
C18:1n-9	4,49	1,78	2,11	6,75	2,40	2,72
C20:1n-11	-	74,94	-	58,51	65,52	-
C22:1n-9	-	-	-	-	-	-
C24:1n-9	-	-	-	-	-	-
C18:2n-6	2,87	2,76	5,60	-	11,35	67,12
C20:2n-6	-	-	-	-	-	-
C22:2n-6	-	-	-	-	-	-
C18:3n-6	73,65	-	58,8	-	-	-
C18:3n-3	-	-	10,15	5,99	-	-
C20:3n-6	-	-	-	-	-	-

Tabela 5.3 Relações entre as porcentagens de lipídios em *Catasetum* em ordem crescente de índice de ligação dupla (ILD).

	<i>Ctsm.</i> <i>juruenense</i>	<i>Ctsm.</i> <i>fimbriatum</i> (2)	<i>Ctsm.</i> <i>osculatum</i> (2)	<i>Ctsm.</i> <i>pulchrum</i>	<i>Ctsm.</i> <i>semicirculatum</i> (1)	<i>Ctsm.</i> <i>fimbriatum</i> (5)	<i>Ctsm.</i> <i>barbatum</i> (1)
Saturados ^a	22,73	20,34	18,68	25,43	17,82	15,50	36,65
Insaturados ^b	77,27	79,66	81,32	74,57	82,18	84,50	63,35
Monoinsaturados ^c	72,91	6,65	78,56	68,58	70,83	67,01	6,49
Poliinsaturados ^d	4,37	2,86	2,76	5,99	11,35	17,49	56,86
Insat/Sat	3,40	3,92	4,35	2,93	4,61	5,70	1,73
Mono/Sat	3,21	0,33	4,21	2,70	3,98	4,52	0,18
Poli/Sat	0,19	0,14	0,15	0,24	0,64	1,18	1,55
Mono/Poli	16,70	2,32	28,49	11,45	6,24	3,83	0,11
IP ^e	6,19	4,78	4,72	13,69	13,12	23,47	113,89
ILD ^f	81,64	82,52	84,080	86,55	93,53	106,29	177,08

^aΣ Ácidos graxos saturados; ^bΣ Ácidos graxos insaturados; ^cΣ Ácidos graxos monoinsaturados; ^dΣ Ácidos graxos poliinsaturados; ^eÍndice de peroxidação; ^fÍndice de ligação dupla.

Tabela 5.3 Cont.

	<i>Ctsm.</i> <i>longifolium</i> (1)	<i>Ctsm.</i> <i>longifolium</i> (2)	<i>Ctsm.</i> <i>fimbriatum</i> (3)	<i>Ctsm.</i> <i>fimbriatum</i> (6)	<i>Ctsm.</i> <i>complanatum</i> (1)	<i>Ctsm.</i> <i>complanatum</i> (2)	<i>Ctsm.</i> <i>denticulatum</i> (1)
Saturados ^a	31,15	27,21	26,55	27,80	25,70	25,66	24,80
Insaturados ^b	68,85	72,79	73,45	72,20	74,30	74,34	75,20
Monoinsaturados ^c	11,22	6,99	7,95	8,86	9,61	7,71	11,01
Poliinsaturados ^d	57,63	65,81	65,51	63,35	64,69	66,63	64,19
Insat/Sat	2,21	2,68	2,77	2,60	2,89	2,90	3,03
Mono/Sat	0,36	0,26	0,30	0,32	0,37	0,30	0,44
Poli/Sat	1,85	2,42	2,47	2,28	2,52	2,60	2,59
Mono/Poli	0,19	0,11	0,12	0,14	0,15	0,12	0,17
IP ^e	110,81	113,10	117,77	121,04	119,41	125,75	125,71
ILD ^f	177,42	185,71	191,03	193,03	193,47	197,94	198,60

Tabela 5.3 Cont.

	<i>Ctsm.</i> <i>semicirculatum</i> (2)	<i>Ctsm.</i> <i>galeritum</i>	<i>Ctsm.</i> <i>fimbriatum</i> (4)	<i>Ctsm.</i> <i>denticulatum</i> (2)	<i>Ctsm.</i> <i>complanatum</i> (4)	<i>Ctsm.</i> <i>complanatum</i> (3)
Saturados ^a	27,28	24,64	19,97	20,81	24,02	24,57
Insaturados ^b	72,72	75,36	80,03	79,19	75,98	75,43
Monoinsaturados ^c	5,61	4,68	14,56	5,35	5,02	5,53
Poliinsaturados ^d	67,11	70,68	65,47	71,61	70,96	69,90
Insat/Sat	2,67	3,06	4,01	3,81	3,16	3,07
Mono/Sat	0,21	0,19	0,73	0,26	0,21	0,23
Poli/Sat	2,46	2,87	3,28	3,44	2,95	2,84
Mono/Poli	0,08	0,07	0,22	0,07	0,07	0,08
IP ^e	129,67	128,74	128,13	130,13	136,99	138,25
ILD ^f	202,25	203,98	207,79	209,14	212,84	213,54

Tabela 5.3 Cont.

	<i>Ctsm.</i> <i>fimbriatum</i> (7)	<i>Ctsm.</i> <i>fimbriatum</i> (1)	<i>Ctsm.</i> <i>osculatum</i> (3)	<i>Ctsm.</i> <i>ciliatum</i>	<i>Ctsm.</i> <i>osculatum</i> (1)	<i>Ctsm.</i> <i>barbatum</i> (2)	<i>Ctsm.</i> <i>gladiatorium</i>
Saturados ^a	23,03	21,24	20,66	17,27	14,93	11,42	13,66
Insaturados ^b	76,97	78,76	79,34	82,73	85,07	88,58	86,34
Monoinsaturados ^c	5,28	3,32	4,78	7,25	8,55	9,45	4,14
Poliinsaturados ^d	71,68	75,44	74,55	75,48	76,52	79,13	82,20
Insat/Sat	3,34	3,71	3,84	4,79	5,70	7,76	6,32
Mono/Sat	0,23	0,16	0,23	0,42	0,57	0,83	0,30
Poli/Sat	3,11	3,55	3,61	4,37	5,13	6,93	6,02
Mono/Poli	0,07	0,04	0,06	0,10	0,11	0,12	0,05
IP ^e	141,20	139,49	143,62	147,60	150,35	151,00	154,69
ILD ^f	218,03	218,17	222,84	229,97	233,70	239,34	240,92

Figura 5.1 – Dendrograma do agrupamento dos 27 acessos de *Catasetum* pelo método UPGMA, utilizando os dados de IP e IDL.

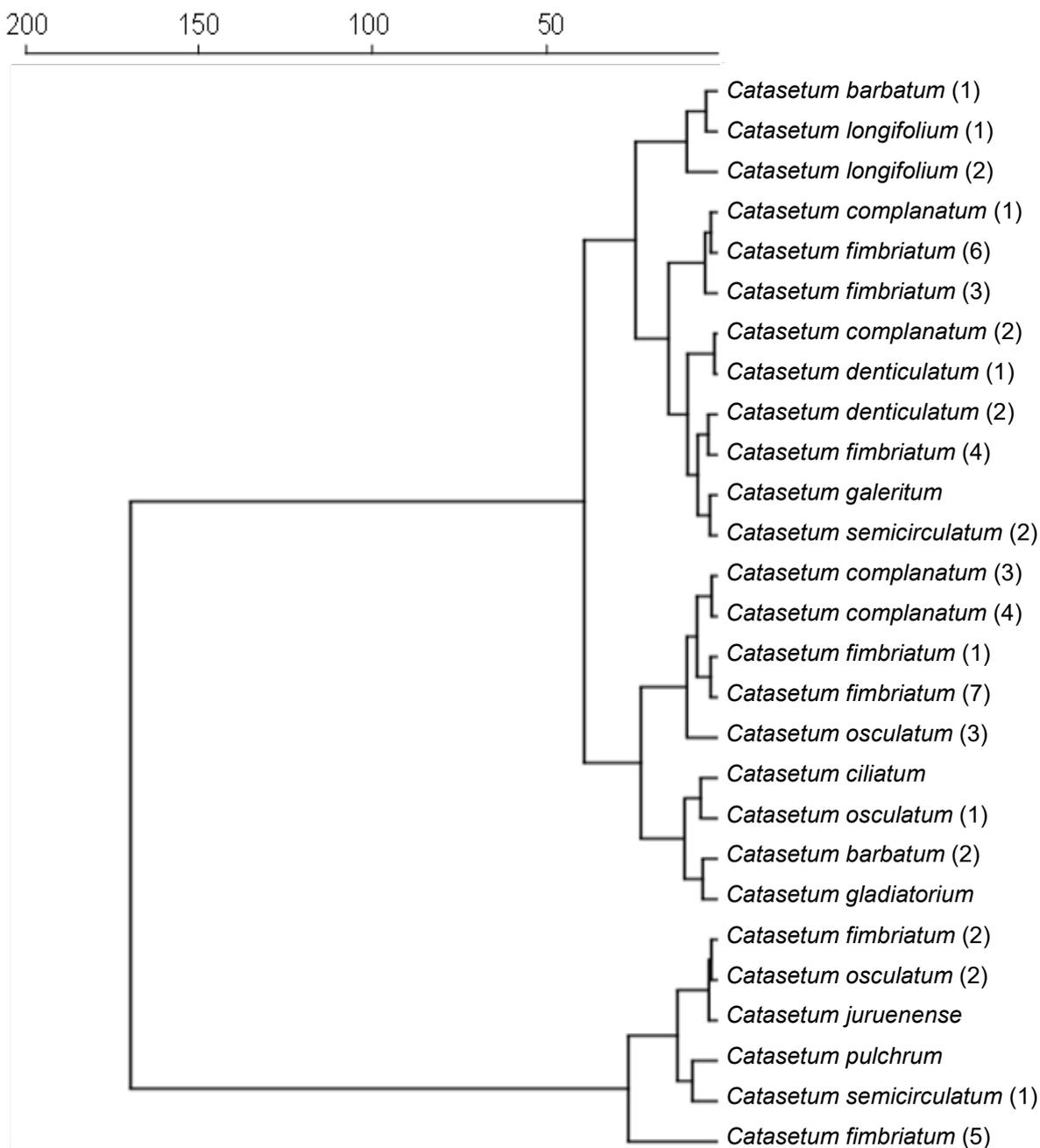
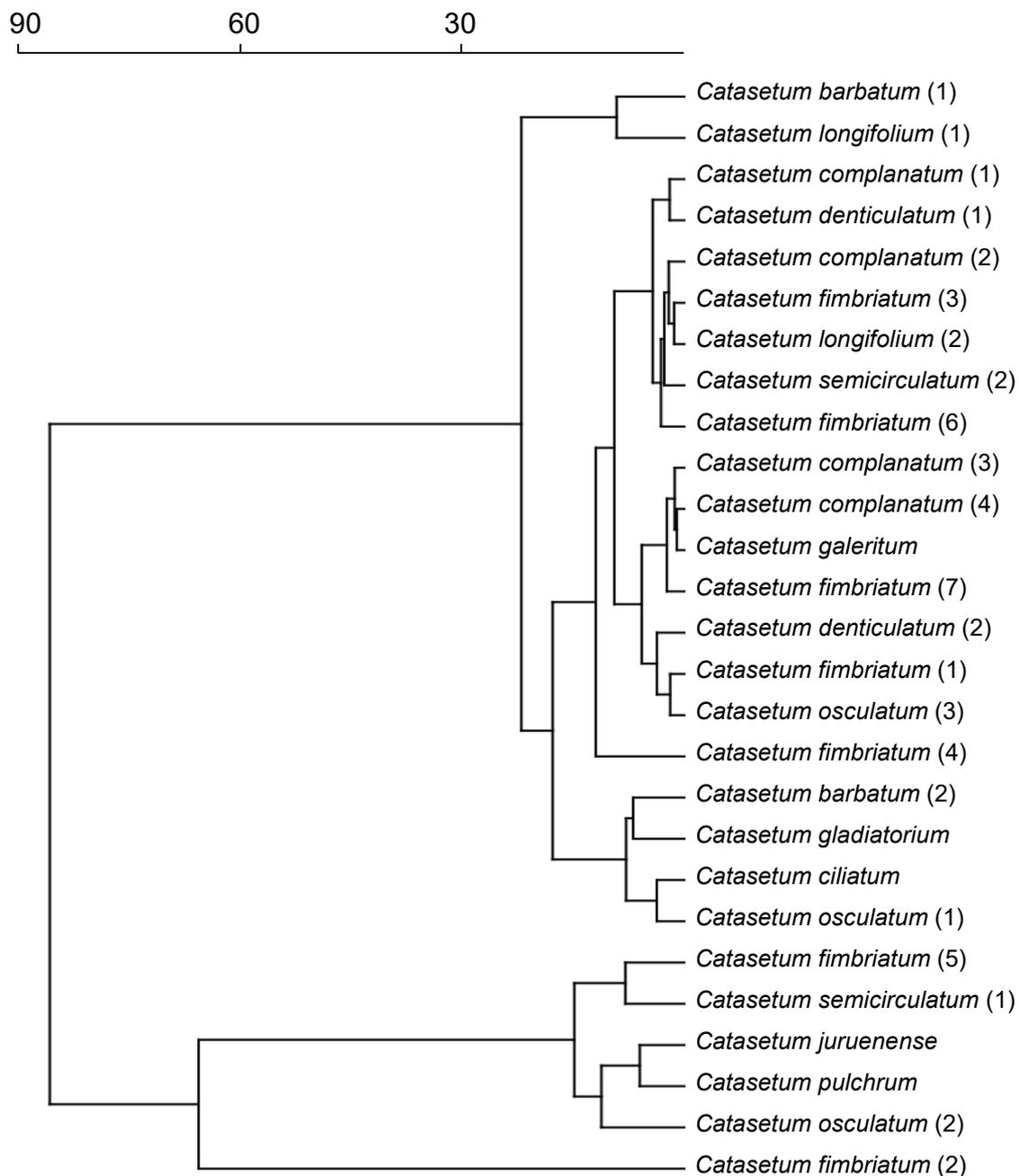


Figura 5.2 – Dendrograma do agrupamento dos 27 acessos de *Catasetum* pelo método UPGMA, utilizando os dados de AGS, AGI, AGM e AGP.



5.4 Discussão

A falta de dados acerca das sementes de orquídeas incomuns e sua germinação é um grande problema que ameaça os programas de conservação (BARSBERG; RASMUSSEN; KODAH, 2013; KENDON *et al.*, 2017). O banco de dados “Seed Oil Fatty Acids” conta com apenas 14 registros de quatro espécies de orquídeas (SOFA, 2011)

De acordo com Manning e Staden (1987), o fato das orquídeas armazenarem em suas sementes lipídios no lugar de carboidratos é um traço evolutivo óbvio. Isso porque os lipídios geram mais que o dobro de energia do que os carboidratos, maximizando a capacidade energética (MARTÍNEZ-FORCE *et al.*, 1998).

Na espécie *Cymbidium sinense*, formas de amido estão presentes nas células do embrião jovem e, com a maturação, os vacúolos contendo amido se desfazem no citoplasma e proteínas e gotículas lipídicas se acumulam (YEUNG; ZEE; YE, 1996).

As combinações e quantidades de lipídios variam entre os gêneros e espécies (COLVILLE *et al.*, 2015; HENGLING *et al.*, 2021a). Os dados aqui obtidos também apresentam variação entre as espécies de *Catasetum*. Os valores mais elevados de IP e ILD em *Ctism. gladiatorium*, sugerem que esta espécie está mais suscetível à dano oxidativo que os acessos com valores menores, implicando em deterioração durante o armazenamento (RATAJCZAK; PUKACKA, 2005), o que pode ocorrer também nas espécies *Ctism. barbatum* (2), *Ctism. osculatum* (1), *Ctism. ciliatum* entre outras espécies de índices elevados.

Os valores de IP e ILD estão acima ou abaixo dos observados por Hengling *et al.* (2021) e Colville *et al.* (2015). Os valores de *Grammatophyllum scriptum* foram descritos como significativamente maiores que *Dactylorhiza fuchsii*, no trabalho de Colville *et al.* (2015), sugerindo maior susceptibilidade à danos, outrossim, destacamos o risco elevadíssimo da grande maioria dos acessos aqui estudados, com exceção de *Ctism. osculatum* (2), *Ctism. fimbriatum* (2), *Ctism. juruenense*, *Ctism. semicirculatum* (1), *Ctism. pulchrum* e *Ctism. fimbriatum* (5) que possuem valores de IP abaixo de 24 e IDL abaixo de 107.

Não há na literatura a relação entre o perfil lipídico e a melhor metodologia de armazenamento de modo a aumentar a viabilidade das sementes de orquídeas.

Cada tipo de ácido graxo possui um ponto de fusão, exercendo influência decisiva na tomada de decisões sobre a temperaturas a que serão submetidas as sementes (SOUZA; MATSUSHITA; VISENTAINER, 1998). O ponto de fusão dos lipídios das sementes pode influenciar na germinação pós-resfriamento, porque sementes cujos lipídios são fluidos nas temperaturas de armazenamento, tem menos chance de comprometimento do que espécies com ponto de fusão acima dessas temperaturas, uma vez que podem restar lipídios cristalizados no momento da germinação (MIRA *et al.*, 2019).

Sabe-se que ácidos graxos insaturados possuem ponto de fusão mais baixos que ácidos graxos saturados. Os resultados apresentados na tabela 5.3, exibem valores de AGI mais elevados que AGS, o que nos leva a crer que a baixa temperatura não é o fator crítico no armazenamento da maioria das espécies de *Catsetum*. Entretanto, cada espécie dentro do gênero e, cada acesso dentro da espécie pode ter seu perfil diferenciado devido a região de origem e adaptação ao clima em que habita (ZHANG *et al.*, 2015).

A insaturação de ácidos graxos pode contribuir para longevidade das sementes, em uma relação negativa entre IDL e longevidade (HOEKSTRA, 2005). Os ácidos graxos poli-insaturados são extremamente sensíveis a oxidação (HOEKSTRA, 2005). Talvez seja necessária a adição de antioxidantes como tocoferóis ou ácido ascórbico para minimizar o processo de oxidação (DOLATABADIAN; ALI; MODARRES, 2008; SHAHIDI, 2000).

A análise de clusters pelo método UPGMA agrupou seis acessos, sendo que as cinco espécies que compõem esses acessos são encontradas na região Amazônica. Os demais acessos foram agrupados em um grande cluster mostrando a similaridade entre esses. Não foram observados agrupamentos entre todos os acessos da mesma espécie como em casos de análise de agrupamentos utilizando material genético (OLIVEIRA *et al.*, 2010; PÉREZ-ESCOBAR *et al.*, 2017).

Mauad *et al.* (2022) pontuam que o processo de hibridização é natural entre espécies do gênero *Catsetum*, e deste modo uma planta pode carregar mais de uma linhagem gênica. Fator este, que pode também ter influenciado na composição das reservas lipídicas aqui averiguadas.

Tais diferenças observadas nos lipídios entre os acessos de mesma espécie não são inusitadas, devido a suas regiões de origem, condições durante a frutificação como temperatura e precipitação ou mesmo o estágio de maturação da

semente (BAREKE, 2018; LAL; SINGH, 2020; NELSON; CHEW, 1977; SITA *et al.*, 2018).

Com novas análises de perfis lipídicos de outras espécies e acessos, bem como em diferentes estágios de maturação, será possível avaliar os padrões das reservas e determinar a melhor metodologia para armazenamento em longo prazo.

5.5 Conclusão

A caracterização de lipídios de sementes de orquídeas fornece informações valiosas acerca dos materiais de reserva das sementes, permitindo aprimorar as metodologias em baixas temperaturas visando a longevidade.

Acessos da mesma espécie que apareceram distantes nas análises de clusters, podem resultar de processos naturais de hibridização ou mesmo das condições ambientais em que foram cultivados.

Os perfis lipídicos aqui obtidos com os 27 acessos, mostram que a maioria das *Catasetum* estão suscetíveis a oxidação lipídica, e necessitam de alterações nas atuais metodologias para o armazenamento em baixas temperaturas.

Referências

- ARDITTI, J. An history of orchid hybridization, seed germination and tissue culture. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.89, n.4, p.359–381, 1984.
- BAREKE, T. Biology of seed development and germination physiology. **Advances in Plants & Agriculture Research**, v.8, n.4, p.336–346, 2018.
- BARSBERG, S.; RASMUSSEN, H. N.; KODAH, N. Composition of *Cypripedium calceolus* (Orchidaceae) seeds analyzed by attenuated total reflectance IR spectroscopy: In search of understanding longevity in the ground. **American Journal of Botany**, v.100, n.10, p.2066–2073, 2013.
- COLVILLE, L. *et al.* Development of a reliable GC-MS method for fatty acid profiling using direct transesterification of minimal quantities of microscopic orchid seeds. **Seed Science Research**, v.26, n.1, p.84–91, 2015.
- DOLATABADIAN, A.; ALI, S.; MODARRES, M. Effect of the ascorbic acid, pyridoxine and hydrogen peroxide treatments on germination, catalase activity, protein and

malondialdehyde content of three oil seeds. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, v.36, n.2, p.61–66, 2008.

HENGLING, M. M. *et al.* Storage of Brazilian *Cattleya* seeds from diverse biomes: lipid composition and effects on germination. **Plant Biosystems**, v.155, n.3, p.487–497, 2021.

HOEKSTRA, F. A. Differential longevities in desiccated anhydrobiotic plant systems. **Integrative and Comparative Biology**, v.45, n.5, p.725–733, 2005.

KENDON, J. P. *et al.* Collecting near mature and immature orchid seeds for ex-situ conservation: ‘in vitro collecting’ as a case study. **Botanical Studies**, v.58, n.1, p.34, 2017.

LAL, N.; SINGH, M. Prospects of plant tissue culture in orchid propagation: A review. **Indian Journal of Biology**, v.7, n.2, p.103–110, 2020.

MANNING, J. C.; STADEN, J. VAN. The development and mobilisation of seed reserves in some African orchids. **Australian Journal of Botany**, v.35, n.3, p.343–353, 1987.

MARTÍNEZ-FORCE, E. *et al.* Fatty acid composition in developing high saturated sunflower (*Helianthus annuus*) seeds: maturation changes and temperature effect. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.46, n.9, p.3577–3582, 1998.

MAUAD, A. V. S. R. *et al.* Phylogenetic and molecular dating analyses of *Catasetum* (Orchidaceae) indicate a recent origin and artificial subgeneric groups. **Revista Brasileira de Botânica**, v.45, n.4, p.1235–1247, 2022.

MIRA, S. *et al.* Lipid thermal fingerprints of long-term stored seeds of Brassicaceae. **Plants**, v.8, n.10, p.414, 2019.

NELSON, J. F.; CHEW, R. M. Factors affecting seed reserves in the soil of a Mojave Desert Ecosystem, Rock Valley, Nye County, Nevada. **American Midland Naturalist**, v.97, n.2, p.300–320, 1977.

OLIVEIRA, L. DO V. R. *et al.* Genetic analysis of species in the genus *Catasetum* (Orchidaceae) using RAPD markers. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.53, n.2, p.375–387, 2010.

PAMPLONA, R. *et al.* Mitochondrial membrane peroxidizability index is inversely related to maximum life span in mammals. **Journal of Lipid Research**, v.39, p.1989–1994, 1998.

- PÉREZ-ESCOBAR, O. A. *et al.* Multiple geographical origins of environmental sex determination enhanced the diversification of Darwin's favourite orchids. **Scientific Reports**, v.7, p.12878, 2017.
- RASMUSSEN, H. N. Cell differentiation and mycorrhizal infection in *Dactylorhiza majalis* (Rchb. f.) Hunt & Summerh. (Orchidaceae) during germination *in vitro*. **New Phytologist**, v.116, n.1, p.137–147, 1990.
- RATAJCZAK, E.; PUKACKA, S. Decrease in beech (*Fagus sylvatica*) seed viability caused by temperature and humidity conditions as related to membrane damage and lipid composition. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.27, n.1, p.3–12, 2005.
- RICHARDSON, K. A.; PETERSON, R. L.; CURRAH, R. S. Seed reserves and early symbiotic protocorm development of *Platanthera hyperborea* (Orchidaceae). **Canadian Journal of Botany**, v.70, n.2, p.291–300, 1992.
- ROOS, E. E.; DAVIDSON, D. A. Record longevities of vegetable seeds in storage. **HortScience**, v.27, n.5, p.393–396, 1992.
- SEATON, P. T.; PRITCHARD, H. W. Life in the freezer - Orchid seed banking for the future. **Orchids**, v.77, n.10, p.762–773, 2008.
- SHAHIDI, F. Antioxidant factors in plant foods and selected oilseeds. **BioFactors**, v.13, n.1–4, p.179–185, 2000.
- SITA, K. *et al.* Impact of heat stress during seed filling on seed quality and seed yield in lentil (*Lens culinaris* Medikus) genotypes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.98, n.13, p.5134–5141, 2018.
- SOFA. Seed Oil Fatty Acids. Max Rubner-Institut. Disponível em: <http://sofa.mri.bund.de/>. Acesso em: 20 ago. 2020.
- SOUZA, N. E. DE; MATSUSHITA, M.; VISENTAINER, J. V. Ácidos graxos: estrutura, classificação, nutrição e saúde. **Arquivos da Apadec**, v.2, n.2, p.102–107, 1998.
- YEUNG, E. C.; ZEE, S. Y.; YE, X. L. Embryology of *Cymbidium sinense*: Embryo development. **Annals of Botany**, v.78, n.1, p.105–110, 1996.
- ZHANG, J.-L. *et al.* Effects of phylogeny and climate on seed oil fatty acid composition across 747 plant species in China. **Industrial Crops and Products**, v.63, p.1–8, 2015.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para melhores taxas de germinação, é recomendado o pré-tratamento das sementes com solução de sacarose 10% por 24 horas em temperatura ambiente, independente do meio de cultura a ser utilizado.

O teste de tetrazólio é um bom preditor da germinação de algumas espécies de *Catasetum*, contudo o meio de cultura e a baixa temperatura de armazenamento podem influenciar a germinação de outras espécies de orquídeas mais exigentes.

Os melhores resultados de germinação após 20 meses de armazenamento, mostram como satisfatório para retardar a perda de viabilidade a temperatura de -18 °C, para as espécies avaliadas.

De modo a aprimorar as metodologias de conservação de sementes em baixas temperaturas, a caracterização do perfil lipídico de sementes de *Catasetum*, fornece informações valiosas. Os resultados obtidos, mostram que a maioria das sementes de *Catasetum* estão suscetíveis a oxidação lipídica, e necessitam de modificações nas metodologias de armazenamento para manutenção da viabilidade a longo prazo.