



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

JÉSSICA FONTES FILETI

CONSERVAÇÃO DE POLÍNEAS DE ESPÉCIES AMEAÇADAS DE *Cattleya* sp.
EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO

Presidente Prudente - SP
2020

JÉSSICA FONTES FILETI

**CONSERVAÇÃO DE POLÍNEAS DE ESPÉCIES AMEAÇADAS DE *Cattleya* sp.
EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO**

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

Orientador:
Nelson Barbosa Machado Neto

635.934 4
F481c

Fileti, Jéssica Fontes.

Conservação de políneas de espécies ameaçadas de *Cattleya* sp. em diferentes condições de armazenamento/ Jéssica Fontes Fileti. – Presidente Prudente, 2020.

59 f.: il.

Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2020.

Bibliografia.

Orientador: Nelson Barbosa Machado Neto

1. Orquídea. 2. Germinação. 3. Banco de germoplasma. 4. Viabilidade. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "CONSERVAÇÃO DE POLÍNEAS DE ESPÉCIES AMEAÇADAS DE *Cattleya* sp.
EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO"

AUTOR(A): JÉSSICA FONTES FILETI

ORIENTADOR(A): Nelson Barbosa Machado Neto

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

Área de Concentração PRODUÇÃO VEGETAL, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dra. Alessandra Ferreira Ribas



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

Prof. Dr. Silvério Takao Hosomi

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. Wagner Vendrame

University of Florida / Gainesville - Estados Unidos



Prof. Dr. Nelson Barbosa Machado Neto

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



Presidente Prudente, 18 de Dezembro de 2020.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à toda minha família e amigos. Ao meu esposo que sempre esteve ao meu lado, me apoiando e incentivando em todos os momentos desde o mestrado. Aos meus pais que sempre fizeram tudo para que eu pudesse estar aqui hoje. Aos meus avós que acreditam em mim, mais do que eu mesma. Aos meus irmãos por todo apoio e carinho. Aos meus amigos que sempre estiveram presentes me incentivando. Aos professores por todos os ensinamentos e capacitação.

AGRADECIMENTOS

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

Agradeço imensamente a todos que sempre estiveram ao meu lado, e que nunca me deixaram esquecer de que eu sou capaz de realizar todos meus sonhos.

Aos meus pais que nunca mediram esforços para me proporcionar oportunidades para que eu pudesse chegar até aqui. E, principalmente, por todo apoio emocional não só durante o período de pós graduação, mas em todos os dias da minha vida.

Ao meu esposo que está diariamente ao meu lado sempre se fazendo presente, e que nunca me deixa duvidar da minha capacidade. Você torna minha vida mais simples e feliz. Obrigada!

Aos meus avós que desde sempre me colocam num “lugar tão alto” que me dá folego para correr atrás dos meus sonhos. Em especial à minha avó materna que está diariamente comigo, me apoiando, me reerguendo, torcendo e rezando por mim.

À minha “boadrasta” que sempre foi como uma mãe, sempre se fazendo presente em todos os momentos da minha vida.

Aos meus irmãos por todo amor e carinho.

Aos meus amigos que sempre acreditaram em mim e que vibram com minhas conquistas.

Ao meu “Querido Orientador” Nelson que sempre foi muito mais que um orientador, se fazendo presente não só na minha jornada acadêmica, como na minha vida pessoal. Obrigada por todos os ensinamentos, tanto de conhecimento

científico/acadêmico, como lições de vida. Obrigada por todos os abraços, todas as lágrimas enxugadas e todas as palavras de conforto.

Aos professores Ceci, Silvério e Alessandra pelos ensinamentos e companheirismo durante todos esses anos.

À Cristiane por toda ajuda no laboratório, momentos de descontração e desabafos. Aos amigos de laboratório pela troca de conhecimento e companheirismo.

À minha psicóloga que me ajuda diariamente no meu processo de autoconhecimento e aceitação.

Finalizo com lágrimas nos olhos e com o coração cheio de gratidão.

Obrigada!

“O amor por todas as coisas vivas, é o mais nobre atributo de um homem.”

Charles Darwin

RESUMO

Conservação de políneas de espécies ameaçadas de *Cattleya* sp. em diferentes condições de armazenamento

O gênero *Cattleya* apresenta orquídeas comumente utilizadas para ornamentação. A intensa pressão de coleta de plantas nativas e a degradação do meio ambiente têm aumentado o número de plantas em extinção. A utilização de bancos de germoplasma é crescente para a preservação e propagação dessas plantas. O objetivo deste trabalho foi estudar as condições de armazenamento para conservação das políneas, avaliando a qualidade das políneas desde sua coleta, e a produção de sementes a partir das políneas armazenadas e frescas. *Cattleya kautskyana* e *C. intermedia* foram utilizadas como espécies modelo. As políneas foram condicionadas em diferentes Umidades Relativas (UR) obtidas por sílica gel (4,5% UR) e soluções de cloreto de lítio (g / 100 mL): 30% UR (52 g), 50% UR (36,4 g) e 80% UR (17,1 g) e armazenado a 5, -18 e -196 °C. Após o equilíbrio, a germinação das políneas foi avaliada periodicamente pelo teste de germinação de políneas e após um ano as políneas foram utilizadas para polinizar flores frescas. As cápsulas das sementes foram coletadas e avaliadas por teste de germinação e tetrazólio. Os dados foram expressos em porcentagem em valores médios e erro padrão e submetidos à análise de variação e comparados pelo teste de Scott-Knot. O efeito de armazenamento variou entre as políneas de ambas as espécies, podendo produzir frutos e sementes. As políneas de *Cattleya intermedia* foram mais afetadas pelo armazenamento, pois não foram capazes de dar frutos em nenhum tratamento armazenado a 5 °C ou poucos a -18 ou -196 °C, e mesmo as sementes produzidas por *C. intermedia* apresentaram baixo vigor. As políneas de *C. kautskyana* foram mais tolerantes à maioria das condições de armazenamento, com maior formação de cápsulas e enchimento de sementes com alta viabilidade e germinação, incluindo alguns tratamentos armazenados a 5 °C. Houve diferenças entre a composição lipídica das políneas e isso afetou o armazenamento e a viabilidade das políneas. *Cattleya intermedia* apresentou alto teor de lipídeos e com altos teores de ácidos graxos saturados nas mesmas implicando em baixa capacidade de armazenamento. A crioconservação a -196 °C foi melhor para ambas as espécies, mas a UR de equilíbrio pode ser diferente.

Palavras-chave: germinação; banco de germoplasma; viabilidade.

ABSTRACT

Pollen conservation of endangered species of *Cattleya* sp. in different conditions of storage

Cattleya are orchids commonly used for ornamentation. The intense collecting pressure of native plants and environment degradation has increased the number of plants under extinction. The use of germplasm banks is crescent to preserve and propagate these plants. The objective of this work was to study the storage conditions for conservation of políneas, evaluating the quality of the pollineas since their collection, and the production of seeds based on the stored and fresh pollineas. *Cattleya kautskyana* and *C. intermedia* were used as model species. Pollineas were conditioned at different Relative Humidity (RH) obtained by silica gel (4.5% RH) and lithium chloride solutions (g/100 mL): 30% RH (52 g), 50% RH (36.4 g) e 80% RH (17.1 g) and stored at 5, -18 and -196 °C. After equilibration pollineas germination was scored periodically and after one year the políneas were used to pollinate fresh flowers. Seed capsules were collected and evaluated by germination and tetrazolium test. Data were expressed in percentage in average values and standard error and submitted to analysis of variation and compared by the Scott-Knot test. The storage effect varied between pollineas of both species being able to produce fruits and seeds. Pollineas of *Cattleya intermedia* were more affected by storage, because they pollineas were not able to set fruits in any treatments stored at 5 °C or a few at -18 or -196 °C, and even the seeds produced by *Cattleya intermedia* showed poor vigour. *Cattleya kautskyana* pollineas were more tolerant to most of conditions of storage, with a higher capsule setting and seed filling with high viability and germination, including some treatments stored at 5 °C. There were differences between lipid composition, which affect the storability and viability of the pollineas. *Cattleya intermedia* showed a high lipid content and with high amounts of saturated fatty acids implying in poor storability. Crioconservation at -196 °C was better for both species but the RH for equilibrium might be different.

Keywords: germination; viability; germplasm banks.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Plantas de <i>Cattleya kautskyana</i>	17
Figura 2: Plantas de <i>Cattleya intermedia</i>	18
Figura 3: Curva de sorção das isotermas de políneas de <i>Cattleya kautskyana</i> e <i>C. intermedia</i> antes do armazenamento.	30
Figura 4: Representação da germinação inicial de políneas de <i>C. kautskyana</i> (A) e <i>C. intermedia</i> (B) através de foto de MO (aumento de 100x). Escala 1µm	31
Figura 5: Germinação (%) de políneas de <i>C. intermedia</i> e <i>C. kautskyana</i> equilibradas à 4,5% de UR (sílica) ao longo de 120 dias armazenamento em três temperaturas (5, -18 e -196 °C).	31
Figura 6: Germinação (%) de políneas de <i>C. intermedia</i> e <i>C. kautskyana</i> equilibradas à 30% de UR ao longo de 120 dias armazenamento em três temperaturas (5, -18 e -196 °C).	32
Figura 7: Germinação (%) de políneas de <i>C. intermedia</i> e <i>C. kautskyana</i> equilibradas à 50% de UR ao longo de 120 dias armazenamento em três temperaturas (5, -18 e -196 °C).	33
Figura 8: Germinação (%) de políneas de <i>C. intermedia</i> e <i>C. kautskyana</i> equilibradas à 80% de UR ao longo de 120 dias armazenamento em três temperaturas (5, -18 e -196 °C).	34
Figura 9: Pegamento dos ovários de <i>C. kautskyana</i> polinizadas com amostras de pólen fresco e armazenado (A); Formação de cápsulas de <i>C. kautskyana</i> após o processo de maturação (B). Pegamento dos ovários de <i>C. intermedia</i> polinizadas com amostras de pólen fresco e armazenado (C); Formação de cápsulas de <i>C. intermedia</i> após o processo de maturação (D).	35
Figura 10: Viabilidade (%) por tetrazólio (Tz) das sementes de <i>C. kautskyana</i> e <i>C. intermedia</i> polinizadas com amostras de pólen fresco (controle) e armazenado.	37
Figura 11: Tetrazólio com pré-condicionamento em sementes de <i>C. kautskyana</i>	38
Figura 12: Representação em foto de sementes de <i>C. kautskyana</i> germinadas em semeadura <i>in vitro</i> após 42 dias de avaliação (aumento de 40x).	39
Figura 13: Germinação (%) das sementes de <i>C. kautskyana</i> polinizadas com amostras de pólen fresco e armazenado.	40
Figura 14: Germinação (%) das sementes de <i>C. intermedia</i> polinizadas com amostras de pólen fresco e armazenado.	42

Figura 15: Comparação do índice de velocidade de germinação (IVG) das sementes de *C. kautskyana* e *C. intermedia* provenientes da polinização com políneas armazenadas e frescas.45

Figura 16: Porcentagem de sementes sem embrião (palha) nas amostras de *Cattleya kautskyana* e *C. intermedia* fecundadas por políneas conservadas em diferentes condições de umidade e temperatura.....46

Figura 17. Varredura calorimétrica diferencial (DSC) de políneas de *Cattleya intermedia* (A) e de *Cattleya kautskyana* (B). Circulos azuis - ácido láurico (12C:0), círculo verde – ácido palmítico (16C:0) e círculo vermelho – ácido esteárico (18C:0).
.....47

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	15
3	REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1	Orchidaceae	16
3.2	Gênero Cattleya	16
3.3	Polinização	18
3.4	Conservação e Armazenamento de Pólen	19
3.5	Grãos de Pólen – Classificação Quanto ao Teor de Água	22
3.6	Germinação <i>in vitro</i> de Políneas	22
4	MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1	Material Biológico	24
4.2	Armazenamento das Políneas	24
4.3	Germinação do Políneas	25
4.4	Obtenção das Sementes	25
4.5	Teste de Germinação em Sementes	26
4.6	Teste de Tetrazólio em Sementes	27
4.7	Análise Térmica	27
4.8	Tratamento Estatístico dos Dados	28
4.8.1	Teor de umidade e germinação de políneas	28
4.8.2	Pegamento de ovários polinizados	28
4.8.3	Viabilidade por tetrazólio	28
4.8.4	Germinação de sementes	28
4.8.5	Índice de Velocidade de germinação e porcentagem de palha	29
5	RESULTADOS	30
5.1	Teor de Umidade e Germinação das Políneas	30
5.2	Pegamento de Ovários Polinizados	35
5.3	Viabilidade das sementes por teste de tetrazólio	36
5.4	Germinação de Sementes	38
6	DISCUSSÃO	48
6.1	Teor de Umidade e Temperatura no Armazenamento de Políneas	48
6.2	Polinização, pegamento e formação de cápsulas de sementes	51
6.3	Viabilidade de Políneas e de Sementes e Formação de Palha	52
7	CONCLUSÃO	54
	REFERÊNCIAS	55

1 INTRODUÇÃO

O grupo Orchidaceae é facilmente encontrado em quase todos os ecossistemas, sendo também o maior em número de espécies entre as Angiospermas. As orquídeas são em sua maioria epífitas, ou seja, utilizam outras plantas como substrato para viver, sem parasitá-las, porém, podem apresentar hábitos rupícolas, terrestres, entre outros.

Os polinizadores são atraídos pelas cores, néctar, odores, óleos e pelo formato de suas flores, que podem confundir com um possível acasalamento ou alimentação. Isto faz com que o inseto tenha contato direto com as políneas, fazendo, dessa forma, o transporte do pólen entre as flores para que ocorra o processo de polinização.

Na maioria das orquídeas a autopolinização é dificultada pela sua morfologia, uma vez que o polinário geralmente é encontrado a frente da cavidade estigmática nas flores hermafroditas. Além de ser mais comum e vantajoso a polinização cruzada dependente de um agente polinizador, aumentando a variabilidade genética. Outra forma de impedir a autopolinização é a autoesterilidade, configurada como barreira genética. Após a polinização, o estigma da flor se fecha e o ovário inicia a formação de cápsulas que contém milhares de sementes. Suas sementes são leves e minúsculas, podendo facilmente ser transportada pelo vento.

As sementes de orquídeas apresentam poucas reservas. Para suprir esse déficit e germinar, estas sementes associam-se a fungos micorrízicos através de um processo chamado simbiose. As sementes por sua vez se desenvolvem e formam plântulas que, posteriormente, serão plantas adultas.

Todo o ciclo de desenvolvimento de uma orquídea, desde a associação aos fungos, os polinizadores e o habitat em que vivem, é afetado com o aumento do aquecimento global. Essas alterações climáticas tornam-se cada dia mais preocupantes, uma vez que interferem diretamente na manutenção dessas espécies na natureza. Outro agravante quando se trata de extinção de orquídeas é a exploração de seu habitat natural.

A criação e manutenção de bancos de germoplasma é uma alternativa para diminuir o risco de desaparecimento de exemplares desta família. Através dos bancos é possível preservar a diversidade genética e aumentar as chances de

reintroduções de espécies na natureza. Os bancos de sementes vêm sendo amplamente estudados para diversas espécies de orquídeas, permitindo a conservação destas.

O armazenamento de pólen é uma alternativa complementar ao banco de sementes, porém, ainda pouco se sabe sobre como as pólenes se comportam sob tais condições, uma vez que este comportamento pode mudar de acordo com as espécies.

Alguns estudos sobre pólenes revelaram que elas apresentam capacidade de sobrevivência durante longos períodos, sugerindo a possibilidade de armazenamento *ex situ*, facilitando assim a criação de bancos de germoplasma. Além do banco de germoplasma de gametas masculinos, o armazenamento de pólen é importante, pois possibilita refazer polinizações malsucedidas, bem como a sincronização da dispersão do pólen e a receptividade floral, junto com as necessidades de hibridação das espécies.

2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi testar condições de umidade (umidade relativa do ar e teor de água das políneas) e temperatura para realização do armazenamento de políneas com o intuito de conservá-las e avaliando a qualidade das políneas armazenadas através de testes de germinação, bem como as sementes resultantes de polinizações com estas políneas – pelos testes de germinação e tetrazólio, e comparando-as com sementes as quais foram produzidas por polinizações com políneas frescas.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Orchidaceae

Orchidaceae é o maior grupo entre as Angiospermas, com aproximadamente 30000 espécies (GOVAERTS *et al.*, 2016), encontradas em quase todos os ecossistemas da Terra com exceção da zona polar (NIKISHINA *et al.*, 2001, 2007), sendo que aproximadamente 10% são encontradas no Brasil (FLORA DO BRASIL, 2020).

São plantas herbáceas perenes, com grande variedade de tamanho, cor das flores, formato de folhas, caules e flores (SCHNEIDERS *et al.*, 2012), apresentando diferentes hábitos de vida, como por exemplo, epífitas, rupestres ou terrestres (FAY; CHASE, 2009). Outra característica das orquídeas é sua dependência de fungos nos primeiros estágios de desenvolvimento até serem capazes de realizar fotossíntese (McCORMICK *et al.*, 2012).

As mudanças climáticas resultantes do aquecimento global são preocupantes já que as orquídeas, com sua dependência simbiótica de fungos em diferentes fases de seus ciclos de vida, habitats e polinizadores são vulneráveis às essas alterações. Essa sensibilidade pode ser um indicador de saúde do ambiente (SEATON; PRITCHARD; MARKS, 2015).

Além das mudanças climáticas, a exploração do habitat também colabora para o desaparecimento de espécies de orquídeas (KOOPOWITZ, 2001). Dessa maneira, bancos de sementes são de extrema importância contra possíveis extinções, além de preservar a diversidade genética e possibilitar reintroduções futuras (SEATON; PRITCHARD, 2003; SEATON; PRITCHARD; MARKS, 2015).

3.2 Gênero *Cattleya*

O gênero *Cattleya* é neotropical, do Panamá até o norte da Argentina com características predominante epifíticas, e em alguns casos rupícolas e terrícolas (PABST; DUNGS 1975; CHASE *et al.*, 2003; VAN DEN BERG, 2008). No Brasil, este gênero tem ocorrências em todas as regiões, sendo suas espécies encontradas principalmente nas regiões da Amazônia, Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica.

Cattleya kautskyana (H.G Jones) (VAN DEN BERG, 2008) é uma espécie epífita e endêmica do Brasil (Flora do Brasil, 2020). São plantas de tamanho médio com pseudobulbos longos e delgados, flores pequenas em formato de estrela e cor amarelo-dourado. Sua floração ocorre, geralmente, no inverno e primavera, entre os meses de junho e setembro (CATTLEYA SOURCE, 2008).

Figura 1- Plantas de *Cattleya kautskyana*



Fonte: A autora.

Cattleya intermedia (Rossi) L. é uma planta de hábitos epífitos ou rupícolas, encontradas nas regiões Sudeste, Sul, mais especificamente na região de Mata Atlântica (FLORA DO BRASIL, 2020). São plantas de porte médio com pseudobulbos curtos e flores grandes (aproximadamente 12,5cm) e de coloração branca ou rosa com labelo rosa escuro. Sua floração ocorre entre a primavera e verão (CATTLEYA SOURCE, 2008).

Figura 2- Plantas de *Cattleya intermedia*.



Fonte: A autora.

3.3 Polinização

O pólen de orquídea é encontrado, na maioria das espécies, em forma de políneas (ou pollinium) que são massas de pólen compactas, geralmente constituídas por massulas, ou seja, agrupamento de tétrades unidas e ligadas a uma caudícula (PACINI; HESSE, 2002). Essa estrutura das políneas pode conferir maior viabilidade do pólen a longo prazo, porém, devido ao grande número de espécies existentes, poucos são os táxons estudados sistematicamente e ecologicamente (BELLUSCI *et al.*, 2010). Além disso, diminuem a perda de pólen durante o transporte realizado pelo polinizador, aumentando a probabilidade de deposição em um estigma coespecífico (MARKS; SEATON; PRITCHARD, 2014).

Ao entrar em contato com o estigma da flor, os grãos de pólen absorvem água das células da superfície estigmática, ocorrendo a germinação e a formação dos tubos polínicos. A combinação do grão de pólen germinado, com o núcleo do tubo e as duas células espermáticas (formadas pela divisão da célula geradora), é chamada de gametófito masculino maduro (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001).

Segundo Sousa (2002), os grãos de pólen são diferentes de acordo com as espécies das plantas, podendo ter diferentes formatos e tamanhos. Em algumas espécies ocorre a formação de barreiras físicas que impedem a autofecundação, fazendo-se necessário a interferência de polinizadores. Além disso, a individualidade

dos tipos de pólen pode fazer com que haja rejeição de um pólen de uma espécie para outra.

A polinização pode ocorrer de duas formas: 1) autopolinização (polinização direta ou autogamia): é quando a transferência de pólen ocorre das anteras para o estigma da mesma flor ou em flores da mesma planta; e 2) polinização cruzada (alogamia): quando o pólen é transferido da antera de uma flor para o estigma de outra flor de outra planta, aumentando a variabilidade genética e promovendo maior vigor para as espécies. Muitas fanerógamas apresentam-se propícias a autopolinização, porém há mecanismos morfológicos e fisiológicos que impedem de ocorrer: a) hercogamia – quando as anteras e o estigma da flor estão dispostos de maneira que impeça a autopolinização; b) autoesterilidade – quando a flor é fecundada pelo seu próprio pólen, porém seus genes não são compatíveis, impedindo a formação de sementes; c) heteromorfia – quando os estames e estiletos apresentam tamanhos diferentes numa mesma população de flores, e diferença no tamanho e ornamentação do pólen e das papilas estigmáticas; e d) dicogamia – é caracterizado pela liberação do pólen e receptividade do estigma em tempos diferentes (PEREIRA; BRASILEIRO; AMARAL, 2009).

A maioria das espécies de orquídeas apresenta mecanismos florais que evitam a autopolinização (PANSARIN, 2003), porém, quando não há esse tipo de mecanismo, pode ocorrer barreiras genéticas que impedem a formação de frutos como a autoesterilidade (TREMBLAY, 1994),

3.4 Conservação e Armazenamento de Pólen

O armazenamento de pólen é essencial, pois possibilita refazer polinizações malsucedidas, bem como a sincronização da dispersão do pólen e a receptividade floral, junto com as necessidades de hibridação das espécies (TIGHE, 2004), sendo, portanto, uma técnica muito utilizada em estudos de genética e melhoramento de plantas (PIO, 2003). Ainda segundo Tighe (2004), o pólen pode ser armazenado por curtos e longos períodos, conforme as necessidades e objetivos do estudo. O tempo de armazenamento do pólen influencia também nas condições em que ele será exposto. Desta maneira, quanto maior o tempo de armazenamento do pólen, menor será a temperatura utilizada no procedimento. Outro fator importante é a

interferência na viabilidade do pólen quando exposto às altas temperaturas e UR do ar, caracterizando a deterioração, que também é comprovado quando se trata de sementes. Em sementes de orquídeas, os fatores temperatura e umidade foram mais drásticos conforme o aumento do tempo de exposição, diminuindo significativamente a viabilidade das sementes estudadas (FILETI, 2015). Além da UR do ar e temperatura, a presença de oxigênio, fatores genéticos, fisiológicos e físicos dos grãos de pólen podem influenciar na viabilidade (FERREIRA *et al.*, 2007). A viabilidade do pólen pode variar entre indivíduos de uma mesma espécie e até mesmo em lotes de um mesmo indivíduo (SANTOS NETO; KARSBURG; YOSHITOME, 2006).

O armazenamento de pólen, assim como o armazenamento de sementes é essencial para a montagem de bancos de germoplasma, possibilitando a conservação do material genético masculino e feminino, e é extremamente importante para espécies com longos períodos vegetativos, que floresçam poucas vezes ao ano e espécies propagadas vegetativamente (TOWILL, 2000), como as orquídeas.

As baixas temperaturas utilizadas no armazenamento de políneas possibilitam a redução de seu metabolismo e, conseqüentemente maior longevidade (ALVIM, 2008). Dessa forma, as técnicas de armazenamento têm sido cada vez mais minuciosas para que haja o mínimo de interferência na conservação (PIO, 2003).

O armazenamento de políneas proporciona a preservação da viabilidade dos gametas masculinos importantes para o desenvolvimento de híbridos, no qual há necessidade de cruzamento de diferentes genótipos para testar a combinação entre eles, sendo possível através do armazenamento, realizar o cruzamento de materiais do mesmo lote, permitindo o sincronismo no florescimento e a produção de sementes (FERREIRA *et al.*, 2007).

Além dos cuidados com as condições de armazenamento, são necessárias avaliações periódicas para analisar a viabilidade do pólen conservado, sendo ideal realizá-las antes, durante e depois do armazenamento para que seja possível confirmar seus benefícios (SEATON *et al.*, 2018).

Fatores como UR do ar, temperatura e umidade do grão de pólen são essenciais para o sucesso do armazenamento. Para que haja manutenção da longevidade durante armazenamento é importante que o teor de umidade do pólen

esteja baixo, em torno de 8 a 10% (SPRAGUE; JOHNSON, 1977), evitando a formação de cristais de gelo durante o armazenamento, que podem romper a membrana celular do pólen (ALMEIDA, 2011).

A temperatura de armazenamento também influencia nos resultados de longevidade e viabilidade dos grãos de pólen (NEPI; PACINI, 1993). De acordo com Pio (2003), podem-se utilizar freezers, refrigeradores e gases liquefeitos para atingir as condições necessárias, porém essa escolha dependerá dos objetivos do armazenamento a ser realizado e da espécie estudada. Estudos demonstraram que não foi necessário o uso de crioprotetores no armazenamento de políneas de orquídeas (CARVALHO, 2006; VENDRAME *et al.*, 2008).

Segundo Carvalho (2006), o armazenamento de políneas assemelha-se ao de sementes, porém o teor de água do pólen é mais facilmente ajustado. Além disso, exaltou que a qualidade do pólen é um fator de extrema importância no armazenamento, pois quando coletado de anteras muito jovens, velhas ou estressadas, apresentam baixa fertilidade. Outra forma de armazenar políneas é através da criopreservação, que vem sendo utilizada como forma de aperfeiçoamento de programas de melhoramento genético, e que consiste no congelamento em nitrogênio líquido, possibilitando a manutenção da viabilidade por longos períodos de tempo.

O armazenamento de pólen de orquídea realizado pelos pesquisadores do Kew's Millennium SeedBank constatou que o pólen armazenado na forma de políneas, com umidade e temperatura adequada, apresentou longevidade cinética semelhante à detectada em sementes, permitindo que fosse armazenado durante anos e utilizado na formação de novas sementes (MARKS; SEATON; PRITCHARD, 2014). Sendo assim, é importante desenvolver técnicas que garantam o armazenamento ideal e a rápida multiplicação dessas espécies (ENGELMANN, 2011).

O pólen apresenta capacidade de sobrevivência durante longos períodos na flor aberta e durante o transporte pelo polinizador, sugerindo a possibilidade de armazenamento *ex situ*, facilitando a polinização assíncrona e a conservação de germoplasma (MARKS; SEATON; PRITCHARD, 2014).

3.5 Grãos de Pólen – Classificação Quanto ao Teor de Água

Os grãos de pólen podem ser classificados de acordo com o teor de água neles contidas: parcialmente desidratado (PDP) quando o teor de água for inferior a 30% e, parcialmente hidratado (PHP) quando for superior a 30% (NEPI; FRANCHI; PADNI, 2001; FRANCHI *et al.*, 2002). Além disso, é possível diferenciá-los através de sua morfologia. Grãos de pólen com diâmetro maior que 100 μ m, esféricos e sem sulcos (NEPI; FRANCHI; PADNI, 2001) – estrutura responsável pelas variações de forma e volume com perda ou absorção de água (FRANCHI *et al.*, 2011) – geralmente são recalcitrantes (PHP) (NEPI; FRANCHI; PADNI, 2001, PACINI; GUARNIERI; NEPI, 2006; FRANCHI *et al.*, 2007), logo apresentam baixa tolerância à dessecação (FRANCHI *et al.*, 2011), enquanto grãos de pólen PDP são ovoides e com sulcos (NEPI; FRANCHI; PADNI, 2001), sugerindo maior tolerância à dessecação.

3.6 Germinação *in vitro* de Políneas

Para que haja resultados confiáveis é necessário que as metodologias utilizadas sejam testadas e adequadas de acordo com a espécie trabalhada, visto que estas apresentam comportamentos diferentes, podendo interferir na viabilidade do pólen. Entre as metodologias utilizadas para a avaliação de viabilidade dos grãos de pólen, a germinação *in vitro* consegue reproduzir condições semelhantes aos naturais do estilete e estigma, onde o pólen germina e se desenvolve, além de possibilitar a distinção de grãos de pólen viáveis e inviáveis.

A germinação *in vitro* é impulsionada por elementos químicos como o boro, cálcio, magnésio e potássio junto ao meio de cultura, tendo geralmente em sua composição açúcares – que estimulam a germinação dos grãos de pólen, mantendo o equilíbrio osmótico entre o meio e o pólen (STANLEY; LINSKENS, 1974) - e solidificantes, com quantidades específicas de acordo com as necessidades da espécie trabalhada (SOUZA; SCHEMBERG; AGUIAR, 2010). Além da composição do meio de cultura, o pH do meio utilizado é um dos fatores que interfere na eficiência da germinação, que consiste basicamente na emissão do tubo polínico,

porém, para ser considerado germinado é preciso que o tubo polínico tenha o tamanho igual ou maior ao do grão de pólen (PIO, 2003).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material Biológico

Foram utilizadas políneas de *C. kautskyana* e *C. intermedia* coletadas e equilibradas em condições distintas para armazenamento. As plantas foram provenientes do Orquidário Aurora, Taciba – SP.

4.2 Armazenamento das Políneas

Após a antese, as flores foram cortadas e levadas para o laboratório para a coleta. Foram realizadas avaliações para a aferição da umidade do pólen através da transferência das amostras, a cada três dias, da sílica gel para diferentes concentrações de cloreto de lítio (cloreto de lítio saturado, 74,1; 64; 52; 43,5; 36,4; 30; 23,7; 17; 9,4; e 1,7 g 100 mL⁻¹) com o objetivo de obter uma curva de umidade. Inicialmente, foram pesadas separadamente as latinhas de alumínio vazias e as políneas para que ao final do processo de avaliação obtivéssemos o teor de água nas políneas nos diferentes ambientes. Uma vez obtido os valores das latinhas e das políneas, três amostras de cada espécie foram colocadas em pote hermético contendo sílica gel e após 3 dias, as amostras foram retiradas rapidamente e pesadas, e em seguida transferidas para o pote contendo cloreto de lítio. Assim, sucessivamente foram pesadas até o último pote contendo 1,7 g 100mL⁻¹ e posteriormente foram colocadas em estufa a 105 °C por 24h para obtenção do peso seco segundo as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

O condicionamento das políneas foi feito em quatro diferentes umidades relativas, baseadas na curva de umidade, produzidas por sílica gel (4,5% UR) e três soluções distintas de cloreto de lítio (g 100mL⁻¹): 30% UR (52 g), 50% UR (36,4 g) e 80% UR (17,1 g). Depois de equilibradas nos quatro ambientes, as políneas foram colocadas em tubos criogênicos e armazenadas em três condições de temperatura: 5, -18 e -196 °C. E as avaliações periódicas (0, 30, 90 e 120 dias) foram realizadas para quantificar a qualidade das amostras de pólen armazenado (HAY *et al.*, 2008, 2010).

4.3 Germinação do Políneas

A germinação das políneas foi realizada em 3 placas de Petri (35mm x 10mm) por tratamento. O meio utilizado foi o meio ABS (PRITCHARD; PRENDERGAST, 1989) contendo 10 g de ágar, 10 g de sucrose, 1 g de ácido bórico (H_3BO_3) L^{-1} , com pH corrigido para 5,6. A germinação foi realizada sem que as políneas passassem por nenhum processo de desinfecção, para evitar o comprometimento das amostras. Todos os processos da germinação foram feitos em câmara de fluxo laminar, e posteriormente, as placas foram vedadas com plástico filme e transferidas para uma sala de crescimento a 25 ± 3 °C com fotoperíodo de 16h por 48 horas no escuro, onde mantiveram-se por dois ou três dias. Após esse período, as políneas foram retiradas das placas com meio de cultura com auxílio de uma espátula e colocadas em lâminas, onde foram levemente maceradas com um bastão de vidro para que os grãos de pólen se desprendessem, e foram avaliadas por fotos tiradas com microscópio óptico).

A germinação foi realizada periodicamente, ou seja, além do controle (amostras frescas que não foram acondicionadas em umidade e temperatura), as amostras armazenadas sob condições determinadas acima foram germinadas após 30, 90 e 120 dias para avaliação de qualidade. As análises foram realizadas após três dias de incubação, tempo necessário para o crescimento dos tubos polínicos das espécies estudadas. A germinação só é concretizada quando o comprimento do tubo polínico for igual ou maior ao diâmetro do pólen (PASQUAL; PETRI; MATTOS, 1982). As fotos tiradas em MO foram avaliadas separadamente para a quantificação do número de grãos de pólen germinados e não germinados (FIGURA 4).

4.4 Obtenção das Sementes

Após um ano de armazenamento, foi realizada a polinização com as políneas armazenadas e as cápsulas foram obtidas por polinização cruzada. Utilizou-se uma amostra de pólen fresco como controle e quatro plantas foram polinizadas (repetições) para cada tratamento para *C. kautskyana* e três plantas para *C. intermedia*. O processo de colheita foi realizado em períodos diferentes para acomodar os tempos de maturação que variou de seis meses a um ano. Ao colher os frutos, estes foram deixados em envelopes de papel fino e mantidos em

condições ambientais (45% UR, 22 ± 3 °C) até deiscência completa. Foram coletados 61 frutos ao total. As sementes de cada espécie e tratamento foram limpas de sujidades, colocadas em microtubos plásticos apenas com a tampa encaixada sobre uma solução saturada de cloreto de lítio (11% UR) a 20 ± 2 °C até atingirem o equilíbrio higroscópico, quando as sementes apresentaram teor de água entre 6,0 a 6,5% (HENGLING *et al.*, 2020). O grau de umidade foi aferido gravimetricamente com três repetições de 20 mg colocados em tubos de 200 μ L e deixados em estufa a 105 °C por 24h (BRASIL, 2009).

4.5 Teste de Germinação em Sementes

Os testes de germinação das sementes foram realizados em meio MS à meia concentração (MURASHIGE; SKOOG, 1962) contendo Ágar (6g L^{-1}) e sacarose (20g L^{-1}), o pH foi ajustado para 5,6 com NaOH antes da autoclavagem. Posteriormente o meio autoclavado foi dispensado em placas de Petri de 80mm, deixado esfriar, as placas foram vedadas e armazenadas até o uso. Antes da semeadura, 10 mg de sementes de cada cápsula formada foi desinfetada com uma solução de dicloroisocianurato de sódio (NaDCC; 5g L^{-1}) contendo 100 μ L de Tween 80, por 10 minutos com auxílio de seringas de 5 mL. As sementes contidas nas seringas foram lavadas duas vezes com água destilada estéril e colocadas no meio. As semeaduras foram realizadas cápsula por cápsula, em câmara de fluxo laminar (MACHADO-NETO; CUSTÓDIO, 2005). Três placas de Petri foram usadas por espécie como repetições, seladas com filme de PVC e transferidas para uma sala de crescimento a 25 ± 3 °C com fotoperíodo de 16h.

A germinação e o índice de velocidade de germinação (IVG) foram obtidos através da contagem de sementes germinadas pelo número de sementes contidas em três campos delimitados em cada placa e contendo pelo menos 30 sementes por campo. As sementes foram contadas durante seis semanas. As imagens foram capturadas com uma câmera digital Sony DSC-P10, acoplado manualmente à lente ocular de um estéreo microscópio, e foram analisadas como descrito acima. As sementes foram consideradas como germinadas com a expansão da massa embrionária, coloração verde e ruptura do tegumento (estágio 1) de acordo com o método de Seaton e Hailes (1989). A germinação foi expressa em porcentagem de sementes germinadas.

4.6 Teste de Tetrazólio em Sementes

A viabilidade foi avaliada através de um teste tetrazólio (TZ) modificado, utilizando três repetições por amostra. O pré-condicionamento foi realizado em 10 mg de sementes de cada cápsula coletada. Estas foram colocadas em microtubos de 1,5 mL contendo solução de sacarose 10% p/v, e deixadas por 24h em temperatura ambiente. A solução foi drenada com micropipeta e as sementes lavadas duas vezes com água destilada. A solução de tetrazólio à 1% foi adicionada e foi incubada a 40°C em banho-maria por 24 horas no escuro (HOSOMI *et al.*, 2011). Após o período de incubação, a solução de tetrazólio foi descartada, as sementes foram lavadas novamente em água destilada por duas vezes. A solução contendo as sementes foi depositada em uma lâmina de vidro de microscopia e a imagem capturada em um scanner de mesa HP G2710, com uma resolução de 3600 dpi. Para um melhor contraste entre as sementes coloridas foi utilizado um fundo azul colado do lado interno da tampa do scanner. A contagem foi realizada em computador usando o software de visualização de imagens, e para as repetições foram estabelecidos três campos por imagem de cada amostra. Sementes róseo-vermelhas foram consideradas como sementes vivas, enquanto as sementes brancas como mortas.

4.7 Análise Térmica

Políneas sem caudículos foram colocadas em painéis de alumínio de 50 µL, lacradas e pesadas em Ultra-Microbalança UMX2 (Mettler Toledo ± 0,1 µg) para determinação da quantidade exata da amostra, e submetidas à análise térmica por meio de Calorímetro Diferencial de Varredura marca Perkin Elmer modelo DSC 8500. A sequência usada para os ciclos de resfriamento e aquecimento foi a seguinte: a amostra foi mantida por 1 min a 25 °C; resfriada a -100 °C a uma taxa de -10 °C por minuto; mantido por 1 min a - 100 ° C; aquecida de -100 a 50 °C a +10 °C por min; mantida a esta temperatura por 1min; em seguida, resfriada à temperatura ambiente. Três repetições foram feitas para cada tratamento.

4.8 Tratamento Estatístico dos Dados

4.8.1 Teor de umidade e germinação de políneas

Os resultados de germinações de políneas foram transformados em $y = \arcsen\sqrt{\left(\frac{x}{100}\right)}$ para normalizar a variação. Os dados foram expressos em desenho fatorial com três temperaturas e quatro umidades de equilíbrio sendo avaliadas durante o armazenamento. Os tratamentos foram comparados pelas médias \pm desvio padrão.

4.8.2 Pegamento de ovários polinizados

Os dados de pegamento de ovário e quantidade de cápsulas formadas após a polinização foram expressos em porcentagem levando em consideração o número de plantas utilizadas em cada tratamento para cada espécie.

4.8.3 Viabilidade por tetrazólio

O resultado do tetrazólio foi expresso em porcentagem de sementes viáveis, através de valores médios e desvio padrão com delineamento experimental totalmente casualizado.

4.8.4 Germinação de sementes

Os resultados de germinações de sementes foram transformados em $y = \arcsen\sqrt{\left(\frac{x}{100}\right)}$ para normalizar a variação. O delineamento experimental foi um fatorial de três temperaturas por quatro umidades de equilíbrio sendo avaliadas durante o armazenamento em três repetições de 10 políneas cada. Os tratamentos foram comparados pelas médias \pm desvio padrão. Para os resultados da germinação total de sementes de *C. kautskyana* foi realizada uma análise fatorial (temperatura de armazenamento x umidade de equilíbrio higroscópico). Para *C. intermedia* os tratamentos foram analisados como inteiramente casualizado e os tratamentos para

ambas as espécies foram comparados pelo Teste Scott Knott a 5% de probabilidade. As análises foram feitas utilizando o software SISVAR (FERREIRA, 2008).

4.8.5 Índice de Velocidade de germinação e porcentagem de palha

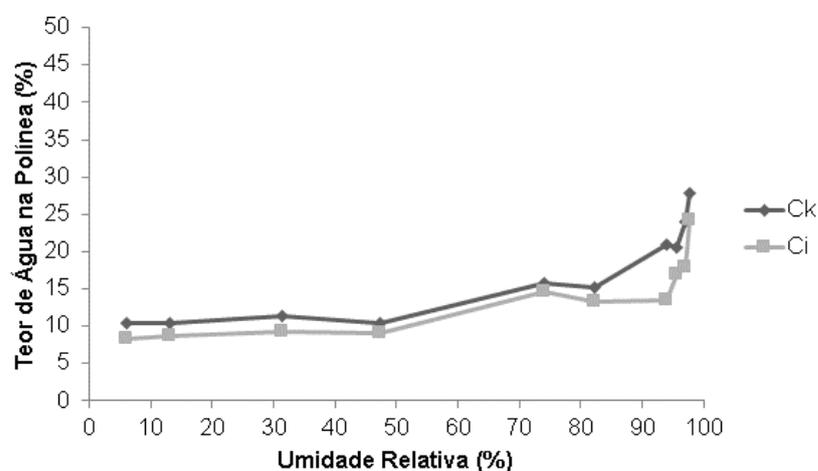
Os resultados de IVG e porcentagem de palha foram transformados em $y = \arcsen\sqrt{\left(\frac{x}{100}\right)}$ para normalizar a variação. Os dados foram expressos em desenho fatorial com três temperaturas e quatro umidades de equilíbrio sendo avaliadas durante o armazenamento. Os tratamentos foram comparados pelas médias \pm desvio padrão e analisados como totalmente casualizados pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) utilizando-se o software SISVAR (FERREIRA, 2008).

5 RESULTADOS

5.1 Teor de Umidade e Germinação das Políneas

As políneas das duas espécies apresentaram curvas de sorção de água com perfis semelhantes, mas com teores nitidamente diferentes até o final. *Cattleya intermedia* apresentou políneas com menor teor de água de que *C. kautskyana*. Dentro de cada espécie, o teor de água das políneas teve pequena variação em UR's que variaram de 4,5 até 50%; à partir deste ponto houve um aumento de aproximadamente 5% para *C. kautskyana* e 4% para *C. intermedia* até atingir 80% de UR e a partir daí houve um incremento mais acentuado chegando em *C. intermedia* até 25% e em *C. kautskyana* até o máximo de 28% em UR próxima de 100% (FIGURA 6).

Figura 3- Curva de sorção das isotermas de políneas de *Cattleya kautskyana* e *C. intermedia* antes do armazenamento.



Os resultados das germinações das políneas de *C. kautskyana* e *C. intermedia* nas diferentes condições de armazenamento estão representados nas figuras 5, 6, 7 e 8 e na figura 4 uma representação da germinação dos grãos de pólen das espécies estudadas.

Figura 4- Representação da germinação inicial de pólenes de *C. kautskyana* (A) e *C. intermedia* (B) através de foto de MO (aumento de 100x). Escala 1µm.

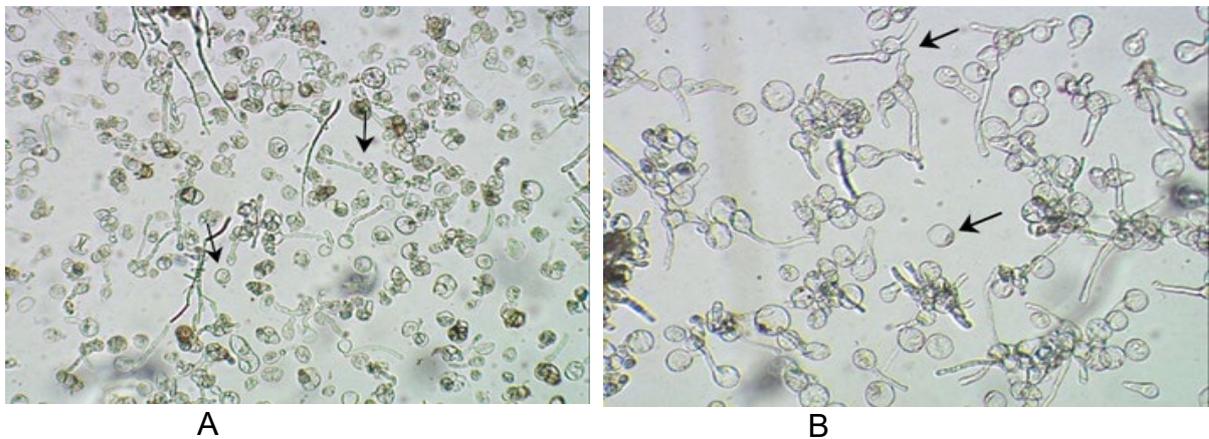
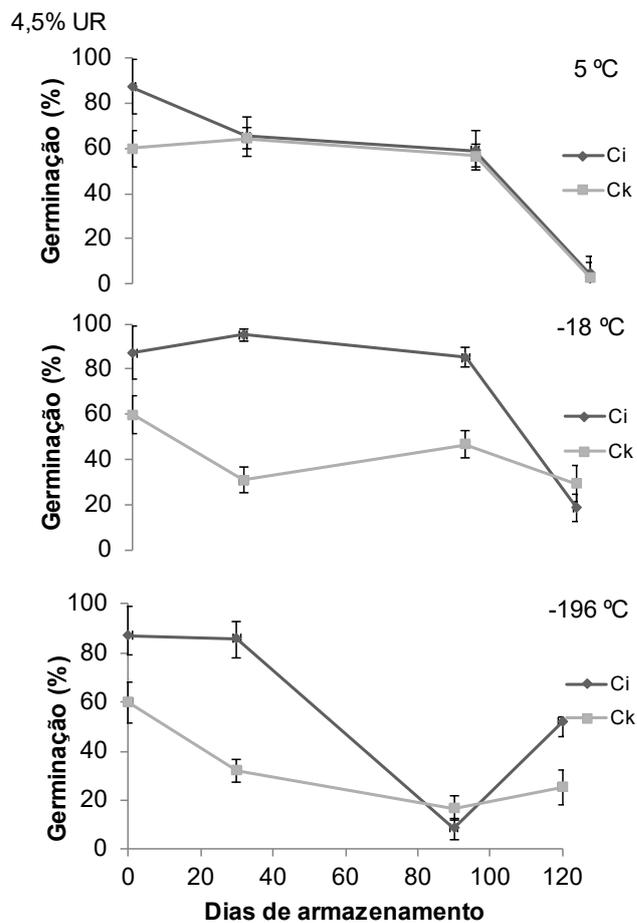


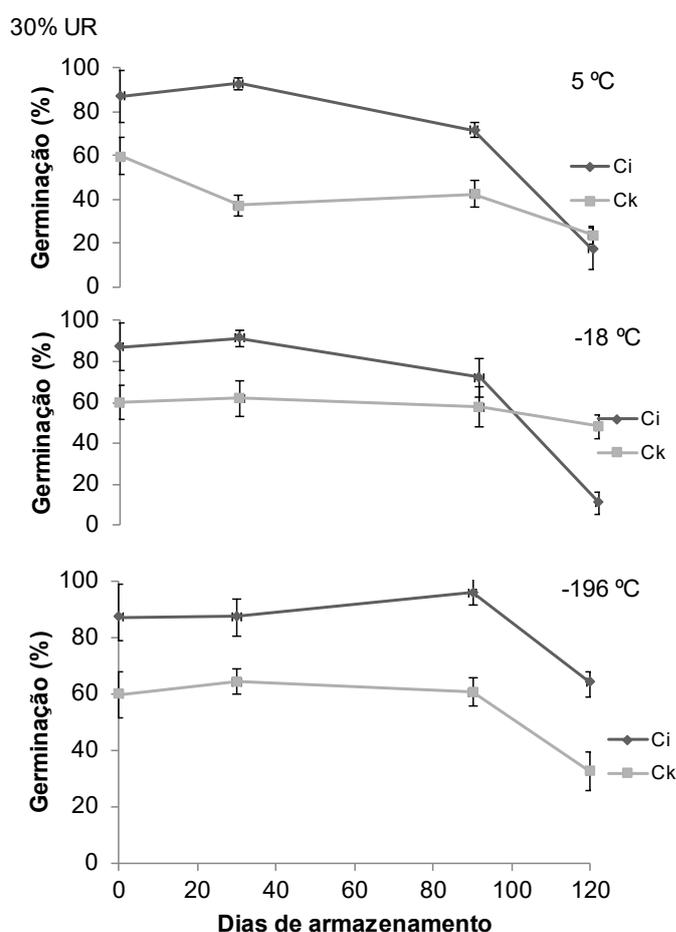
Foto: A autora

Figura 5- Germinação (%) de pólenes de *C. intermedia* e *C. kautskyana* equilibradas à 4,5% de UR (sílica) ao longo de 120 dias armazenamento em três temperaturas (5, -18 e -196 °C).



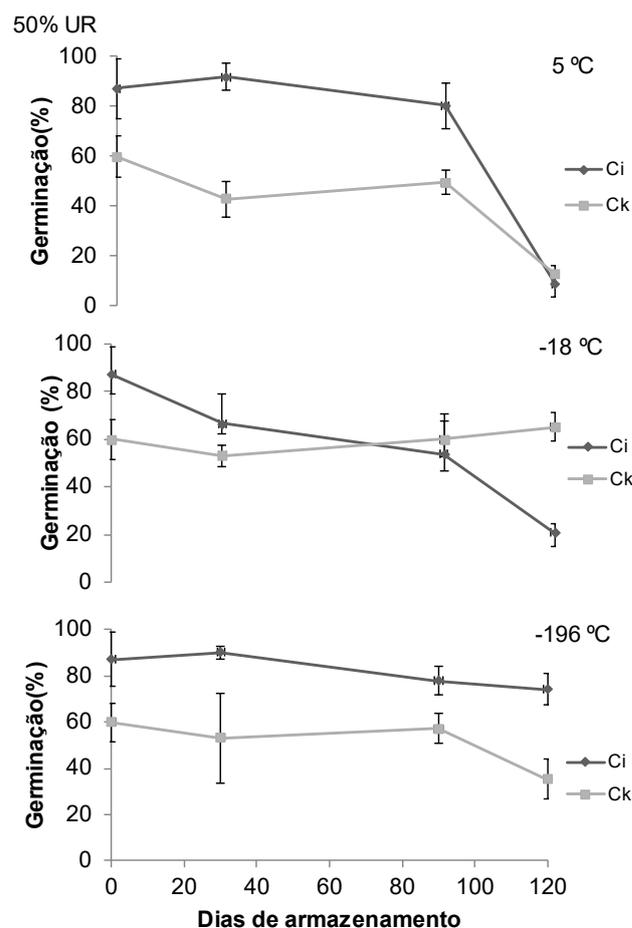
As amostras equilibradas à 4,5% de UR apresentaram germinação entre 20 e 50% ao final das avaliações (120 dias) nos armazenamentos de -18 °C e -196 °C, enquanto nas amostras armazenadas em 5°C, a germinação foi praticamente nula (FIGURA 5). O teor de água das amostras de *C. intermedia* foi inferior a 10% quando equilibradas à 4,5% de UR, o que possibilitou maior capacidade de sobrevivência e germinação nos armazenamentos com temperaturas sub zero. Enquanto *C. kautskyana* apresentou teor de água superior a 10% (FIGURA 3), o que pode ter colaborado para a diminuição da viabilidade das políneas armazenadas. A temperatura mais alta de armazenamento (5 °C) também influenciou na conservação das políneas de ambas as espécies, sendo claramente prejudicial em longos períodos, levando a uma deterioração mais rápida.

Figura 6- Germinação (%) de políneas de *C. intermedia* e *C. kautskyana* equilibradas à 30% de UR ao longo de 120 dias armazenamento em três temperaturas (5, -18 e -196 °C).



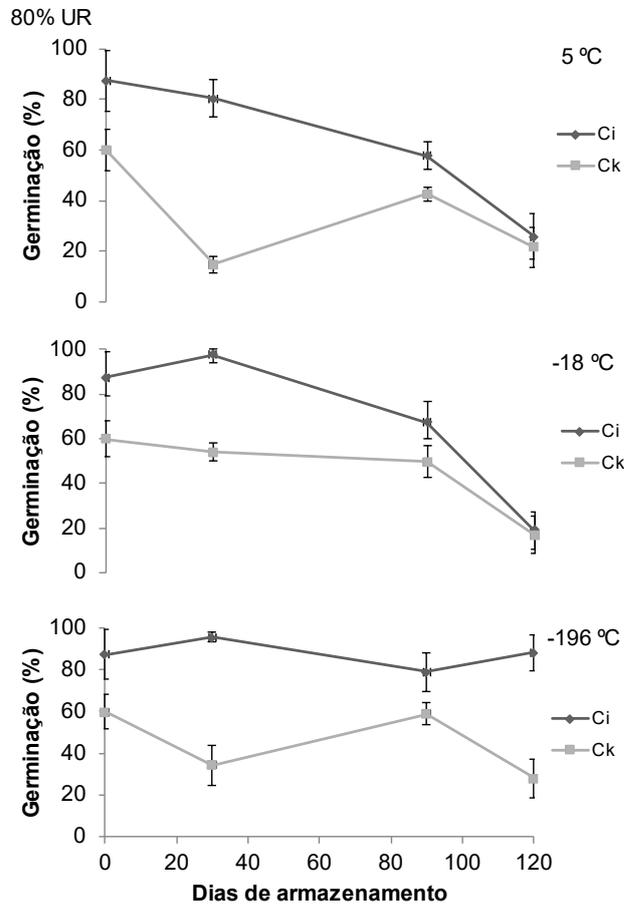
Quando expostas a 30% de UR, as pólineas, de ambas as espécies, armazenadas em 5 °C tiveram a viabilidade significativamente afetada ao final das avaliações, mostrando nitidamente que o fator temperatura está diretamente ligado com a manutenção da viabilidade do material armazenado, diminuindo sua longevidade e comprometendo o seu uso para fins de conservação. À -18 °C as pólineas de *C. kautskyana* tiveram diminuição da viabilidade, enquanto *C. intermedia* teve sua germinação afetada aos 120 dias de avaliação. Em -196 °C, as duas espécies tiveram perfis semelhantes, porém, *C. intermedia* apresentou maior porcentagem de germinação (FIGURA 6).

Figura 7- Germinação (%) de pólineas de *C. intermedia* e *C. kautskyana* equilibradas à 50% de UR ao longo de 120 dias armazenamento em três temperaturas (5, -18 e -196 °C).



Para as amostras condicionadas em 50% de UR, observou-se que estas apresentaram comportamento semelhante as pólineas armazenadas em 30% para todas as temperaturas avaliadas (FIGURA 7).

Figura 8- Germinação (%) de políneas de *C. intermedia* e *C. kautskyana* equilibradas à 80% de UR ao longo de 120 dias armazenamento em três temperaturas (5, -18 e -196 °C).



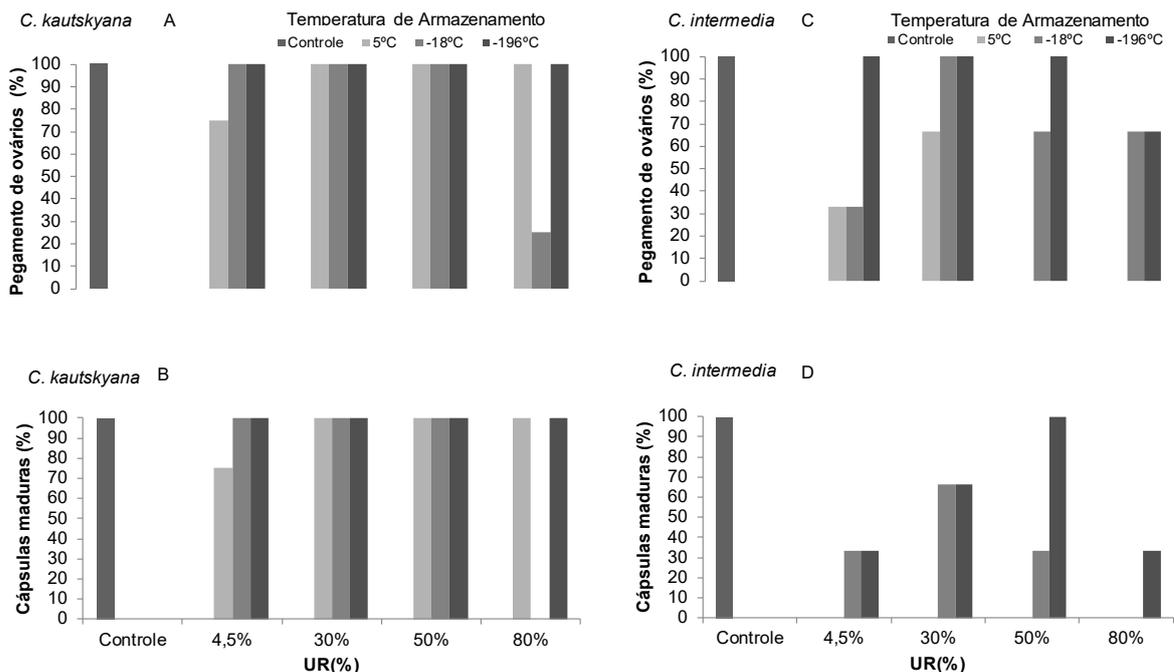
Com 80% de UR, observamos que as amostras tiveram um declínio acentuado na porcentagem de germinação quando armazenadas nas temperaturas de 5 e -18 °C. Todavia, as políneas com um teor de água maior, aproximadamente de 13 e 15%, para *C. intermedia* e *C. kautskyana* respectivamente, apresentaram níveis de germinação maiores que nos outros ambientes de conservação. Mesmo com o conteúdo de água mais elevado, proporcionado pela exposição a alta umidade relativa do ar, o determinante para o armazenamento foi a temperatura, uma vez que em -196 °C, as políneas, principalmente de *C. intermedia*, apresentaram altos níveis de germinação, sendo mais tolerantes ao final dos 120 dias de avaliação (FIGURA 8).

5.2 Pegamento de Ovários Polinizados

Embora a germinação das amostras de pólenes de *C. intermedia* tenha apresentado maior porcentagem em comparação as de *C. kautskyana*, foi possível verificar após a polinização, que as pólenes de *C. kautskyana* tiveram maior porcentagem de pegamento e quantidade de cápsulas formadas (FIGURA 9). Além disso, nas condições de UR avaliadas, as amostras armazenadas em 5 °C tiveram desempenhos inferiores, reflexo da deterioração mais acentuada provocada por temperaturas mais altas, prejudicando assim a qualidade das pólenes.

Após doze meses, as plantas de *C. kautskyana* e *C. intermedia* foram polinizadas com pólen fresco e com amostras de pólen armazenado nas condições mostradas nos gráficos acima. Após 30 dias, as plantas foram avaliadas de acordo com o pegamento e, ao final do processo de maturação, foram quantificadas as cápsulas formadas e avaliadas (FIGURA 9).

Figura 9- Pegamento dos ovários de *C. kautskyana* polinizadas com amostras de pólen fresco e armazenado (A); Formação de cápsulas de *C. kautskyana* após o processo de maturação (B). Pegamento dos ovários de *C. intermedia* polinizadas com amostras de pólen fresco e armazenado (C); Formação de cápsulas de *C. intermedia* após o processo de maturação (D).



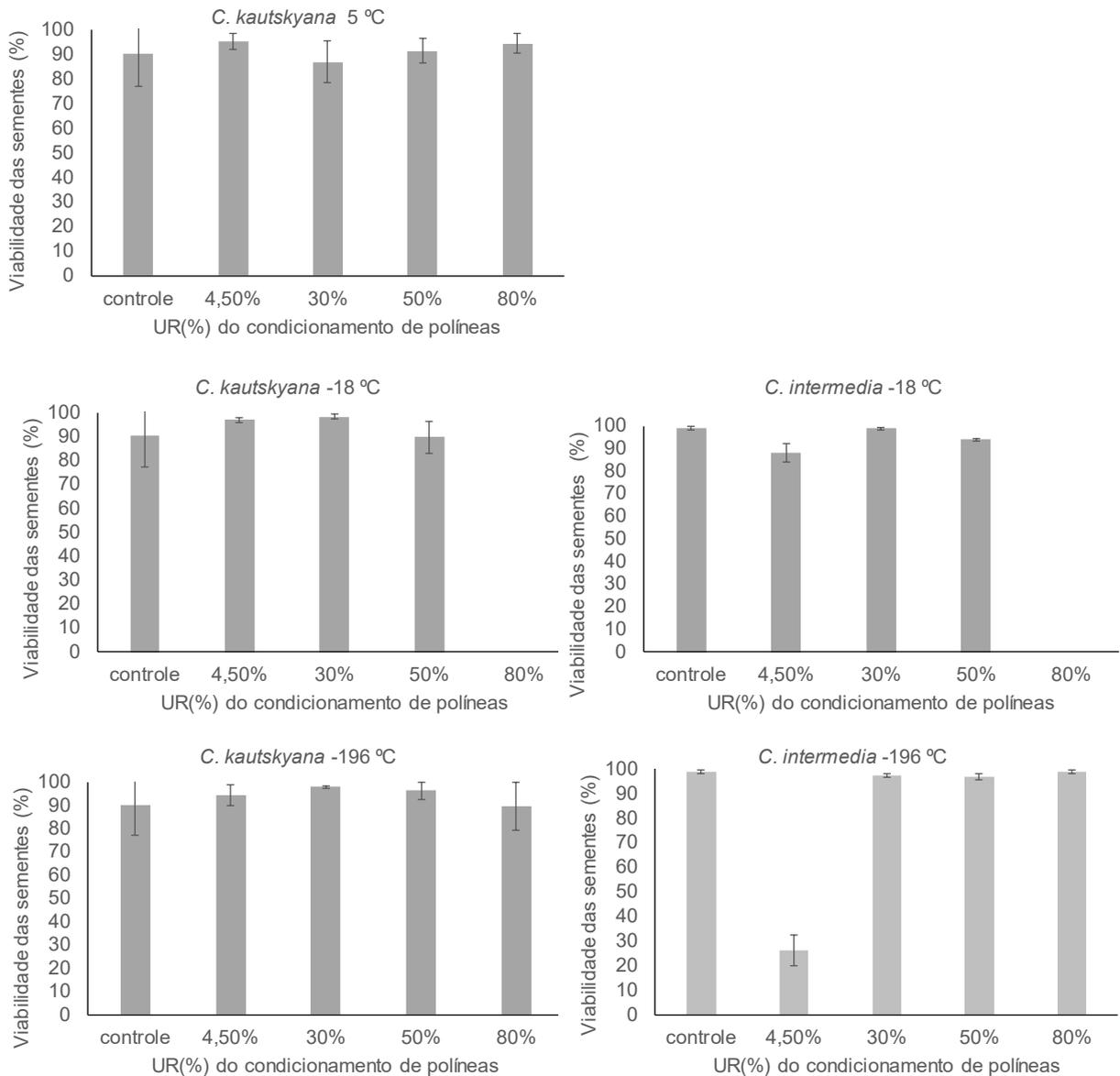
De acordo com os dados obtidos, observamos que o armazenamento foi mais eficiente para as políneas de *C. kautskyana*, uma vez que geram maior quantidade de cápsulas tanto por tratamento como pela comparação entre eles, enquanto *C. intermedia* foi mais afetada, já que as plantas polinizadas demonstraram menor capacidade para formação de cápsulas após serem polinizadas com as políneas submetidas ao armazenamento (FIGURA 9).

Porém, para se confirmar eficácia da polinização para as espécies estudadas, foram avaliadas a germinação e a viabilidade das sementes geradas.

5.3 Viabilidade das sementes por teste de tetrazólio

A partir do teste de tetrazólio foi possível quantificar, em porcentagem, a viabilidade das sementes geradas após a polinização com políneas de cada tratamento. Um ponto importante a ser observado é que as políneas de *C. intermedia* apresentaram porcentagens de germinação maiores do que *C. kautskyana* em praticamente todos os tratamentos após o armazenamento (FIGURAS 5, 6, 7 e 8), porém, após a polinização, observamos que mesmo com porcentagens inferiores de germinação, as políneas de *C. kautskyana* obtiveram maior sucesso quanto ao pegamento das plantas polinizadas e também porcentagem de viabilidade das sementes dos frutos formados (FIGURA 9 e 10). Este dado reforça a importância de analisar não só as políneas como também as sementes oriundas de amostras armazenadas por meio de testes de tetrazólio (FIGURA 10) e germinação, para que assim seja possível avaliar a eficácia do armazenamento.

Figura 10- Viabilidade (%) por tetrazólio (Tz) das sementes de *C. kautskyana* e *C. intermedia* polinizadas com amostras de pólen fresco (controle) e armazenado.



Sendo assim, as políneas de *C. kautskyana* armazenadas geraram cápsulas com sementes viáveis (>80%) para todas as condições de armazenamento, exceto para políneas equilibradas 80% de UR e estocadas à -18 °C. Em contrapartida, as políneas de *C. intermedia* foram mais sensíveis às condições de armazenamento, uma vez que: (a) não houve produção de cápsulas quando armazenadas em 5 °C; (b), em -18 °C, as políneas armazenadas com 80% de UR não se mantiveram viáveis e; (c) as políneas armazenadas a -196 °C e 4,5% de UR produziram sementes com baixa viabilidade (FIGURA 10).

Figura 11- Tetrazólio com pré-condicionamento em sementes de *C. kautskyana*.

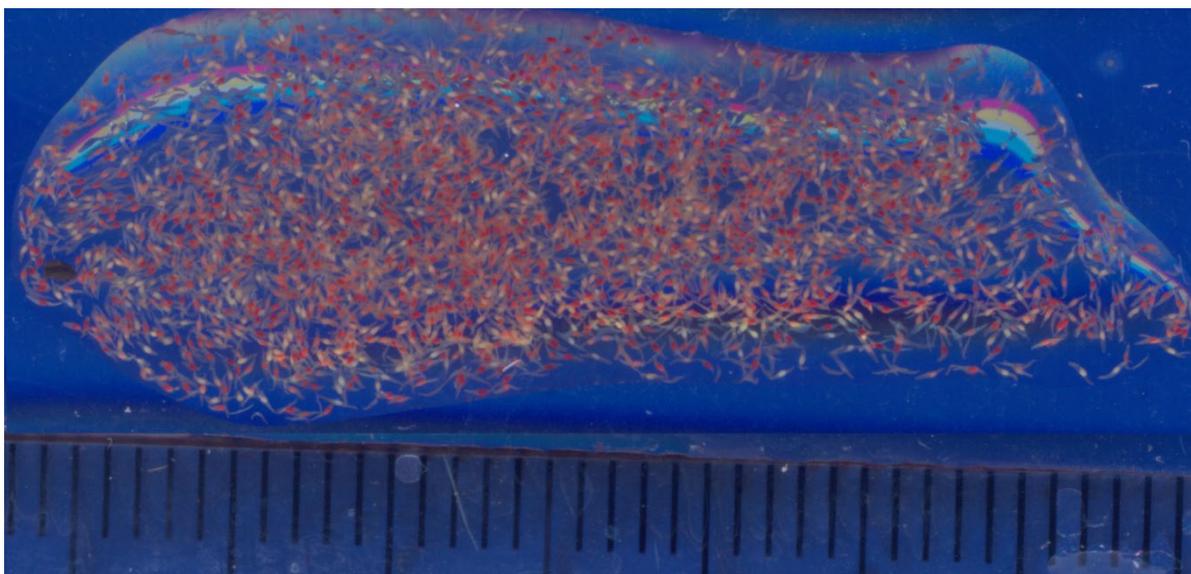


Foto: A autora.

Além da viabilidade, é importante analisar a porcentagem de germinação das sementes geradas a partir de cada tratamento, pois é através dela que é possível concluirmos com mais precisão a qualidade das sementes avaliadas, sendo estes testes, portanto, complementares.

5.4 Germinação de Sementes

Em complemento ao teste de tetrazólio, amostras de sementes de todos os tratamentos passaram por testes de germinação, e foram avaliadas durante 6 semanas a cada sete dias (FIGURA 13 e 14).

Figura 12: Representação em foto de sementes de *C. kautskyana* germinadas em semeadura *in vitro* após 42 dias de avaliação (aumento de 40x).



Foto: A autora.

As sementes geradas a partir de políneas armazenadas em -18 e -196 °C tiveram germinação superior a 90% a partir da segunda semana de avaliação, exceto em -18 °C com 80% de UR. Políneas armazenadas a 5 °C demonstraram menor viabilidade, comparadas ao controle, mas ainda sim deram origem a sementes com alta viabilidade e percentual de germinação, como visto no gráfico (FIGURA 13).

Através da análise fatorial dos dados de germinação das sementes de *C. kautskyana* podemos observar que não houve diferenças significativas, em sua maioria, quando avaliados os resultados de germinação final separadamente, ou seja, apenas temperatura ou umidade. As combinações entre as condições de armazenamento (temperatura e umidade) que apresentaram significância entre os tratamentos, e assim, estabelecendo as melhores condições de estocagem para essa espécie, demonstrando que as temperaturas sub zero combinadas com as umidades relativas se mostraram eficientes para o armazenamento, com exceção das sementes oriundas de políneas armazenadas a -18 °C e equilibradas em 80% de umidade relativa (TABELA 1).

Figura 13- Germinação (%) das sementes de *C. kautskyana* polinizadas com amostras de pólen fresco e armazenado.

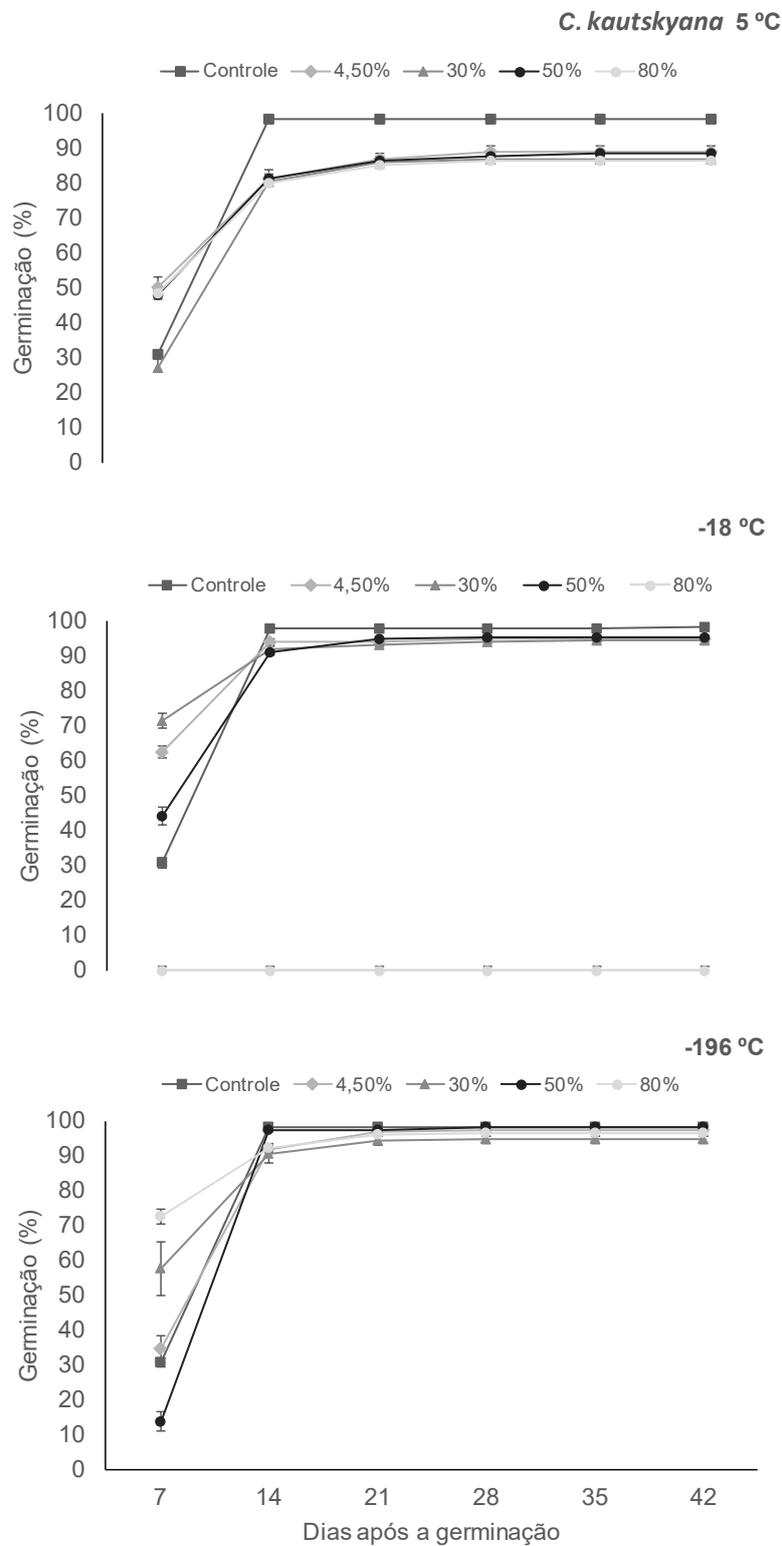


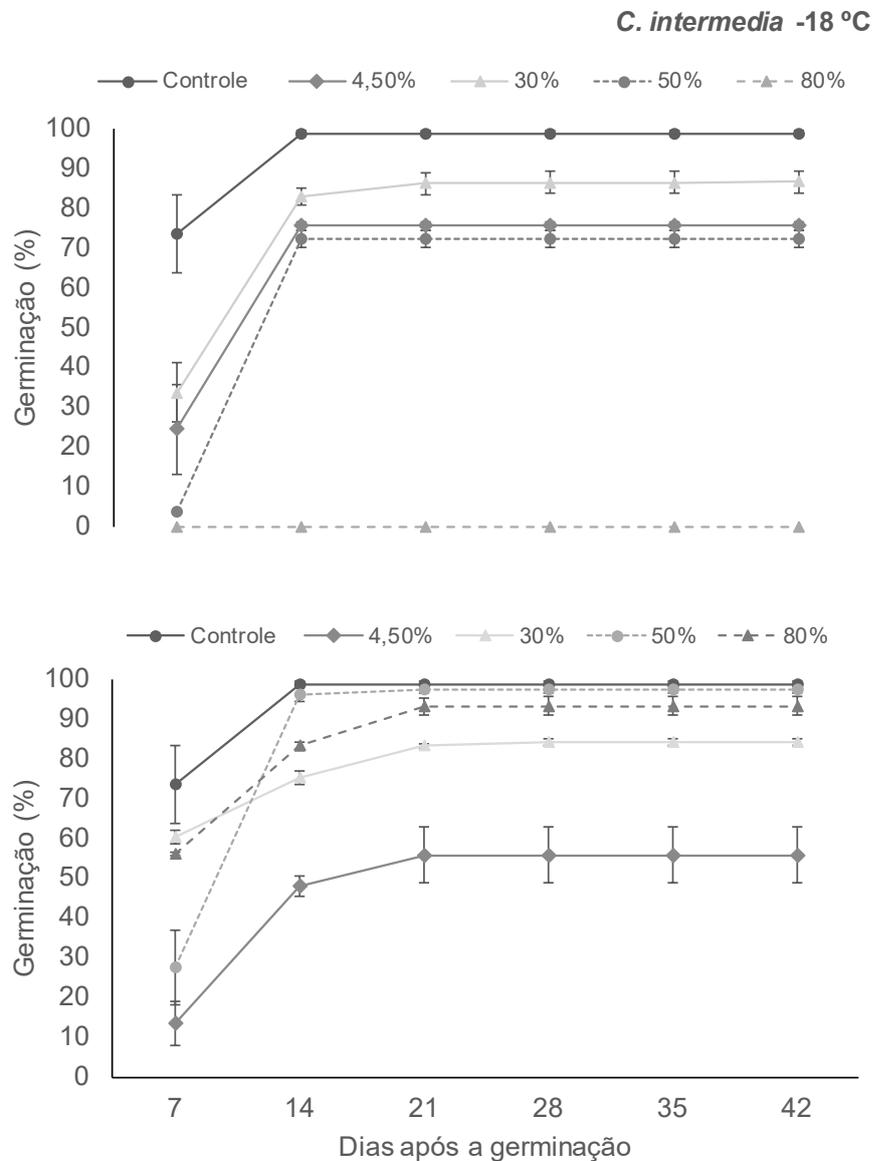
Tabela 1- Germinação total de sementes de *C. kautskyana* oriundas de amostras de políneas equilibradas em diferentes Umidades Relativas e armazenadas em três temperaturas.

Umidade relativa (%)	Temperatura de armazenagem (°C)		
	5	-18	-196
4,5	89,1 b B	95,0 ab A	97.0 a A
30	87 b B	94,7 a A	95,2 a A
50	88 b B	93.7 ab A	97.5 a A
80	86.8 b B	0.00 c C	97.1 a A

Médias seguidas por letras distintas, minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Apesar das políneas de *C. intermedia* apresentarem teor de água abaixo de 30%, sendo considerada PDP, logo, sugerindo a possibilidade de armazenamento, foi possível verificar através do gráfico de tetrazólio (FIGURA 10) que as condições de temperatura e umidade interferiram diretamente na formação de frutos, sendo necessário maior controle das condições de armazenamento dessa espécie para que as políneas se mantenham viáveis por mais tempo, mas principalmente, para que sejam capazes de gerar frutos com sementes viáveis. Os gráficos de germinação também demonstraram a importância do controle do teor de água das políneas de acordo com a temperatura de armazenamento que elas foram submetidas. Em -18 °C, as políneas equilibradas em até 50% de UR apresentaram porcentagens totais de germinação significativas ($\geq 70\%$). Em -196 °C, observou-se que as políneas equilibradas a partir de 30% de UR tiveram germinação acima de 70%. Através desses dados, foi possível observar que as políneas armazenadas de *C. intermedia* foram menos tolerantes às condições propostas de armazenamento, gerando menos frutos para serem avaliados (FIGURA 14).

Figura 14- Germinação (%) das sementes de *C. intermedia* polinizadas com amostras de pólen fresco e armazenado.



Durante o processo de formação das cápsulas (ou frutos) de *C. intermedia* foram observados diferentes tempos de maturação, e o resultado foi uma variação na qualidade das sementes avaliadas (FIGURA 14). Através da análise visual de cada unidade de cápsula, foi possível observar diferenças na coloração das sementes. As cápsulas com sementes mais claras apresentaram menor viabilidade pelo teste de tetrazólio e menor porcentagem de germinação, e conseqüentemente, maior quantidade de palha (semente sem embrião).

Isso pode ter ocorrido: (a) pela variação na qualidade do pólen, uma vez que as políneas utilizadas para a polinização e consequente formação dessas cápsulas poderiam estar com a viabilidade baixa em decorrência do grau mais avançado de deterioração devido aos fatores de armazenamento ou por algum problema na formação dessas políneas conferindo baixa viabilidade, mesmo que as plantas em que foram coletadas estivessem saudáveis; (b) pela diferença no tempo de maturação das cápsulas, impedindo que essas plantas gerassem os frutos com maior porcentagem de sementes viáveis, (c) e também pela variação climática no período de maturação das sementes, afetando diretamente na formação de cápsulas com sementes viáveis.

Embora tenham ocorrido limitações, ainda assim, é possível dizer que o armazenamento de *C. intermedia* foi eficiente, porém, ao contrário de *C. kautskyana*, as políneas de *C. intermedia* precisam de condições mais específicas.

Por causa da não formação de cápsulas de sementes de *C. intermedia* a 5 °C, não foi possível realizar a análise fatorial. Dessa forma, foi realizada a comparação dos resultados totais através do teste Scott Knott a 5% de probabilidade (TABELA 2). Através dos dados obtidos, é possível afirmar que para *C. intermedia* mesmo em temperaturas sub zero, nem todas as umidades testadas geraram resultados satisfatórios, uma vez que o armazenamento de políneas em -196 °C a 4,5% de umidade relativa apresentou apenas 55% de germinação final de sementes, enquanto que políneas armazenadas a -18 °C, equilibradas em 30% de UR, as sementes apresentaram germinação total superior a 90%.

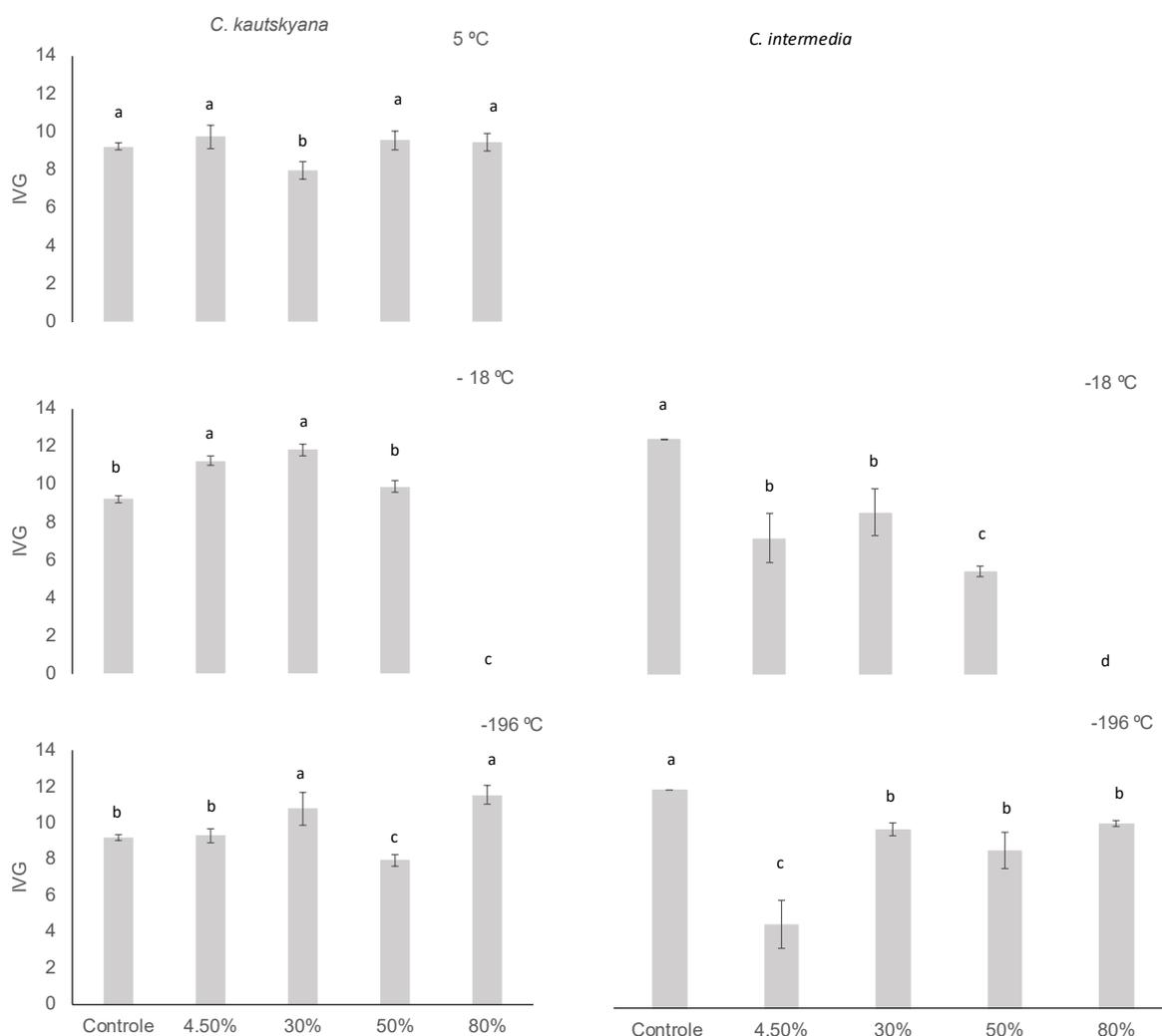
Tabela 2- Análise de germinação total de sementes de *C. kautskyana* e *C. intermedia* oriundas de amostras de políneas frescas e armazenadas.

		Germinação (%)	
		<i>C. kautskyana</i>	<i>C. intermedia</i>
Políneas frescas		98,1 a	99,0 a
Umidade Relativa	Temperatura		
4,5%	5	89,1 b	0,0 d
	-18	95,0 a	75,7 b
	-196	97,0 a	55,9 c
30	5	87,0 b	0,0 d
	-18	94,7 a	94,4 a
	-196	95,2 a	84,2 ab
50	5	88,0 b	0,0 d
	-18	93,7 a	72,5 b
	-196	97,5 a	97,6 a
80	5	86,8 b	0,0 d
	-18	0,0 c	0,0 d
	-196	97,1 a	93,5 a

Médias dentro das espécies diferem entre si pelo teste Scott Knott (**p<0,01).

O IVG é um índice utilizado para mensurar o tempo que cada amostra de semente demorou para germinar. As amostras testadas de *C. kautskyana* apresentaram diferenças em relação a velocidade de germinação, independente dos tratamentos. Por sua vez, as amostras de *C. intermedia* apresentaram IVG diferentes entre os tratamentos, principalmente quando comparados ao controle, demonstrando que o armazenamento das políneas resultou na diminuição da viabilidade das sementes (FIGURA 15).

Figura 15- Comparação do índice de velocidade de germinação (IVG) das sementes de *C. kautskyana* e *C. intermedia* provenientes da polinização com políneas armazenadas e frescas.



Além das sementes com embrião, também encontramos palhas (sementes sem embrião ou vazias) nas cápsulas, que por sua vez não tem capacidade germinativa. Observou-se que as cápsulas de *C. intermedia* apresentaram maior variação de porcentagem de palhas entre os tratamentos, destacando para -196 °C a 80% de umidade com 91% de palha. Além disso, quando comparadas com as cápsulas de *C. kautskyana* foram observadas menores alterações no percentual de palha (de 20 a 53%), mesmo em 5 °C, do que em *C. intermedia*. Isso acontece quando há menor viabilidade nas políneas, logo, os grãos de pólen têm menor capacidade de fecundar os óvulos e formar sementes com embrião (FIGURA 16). Sendo assim, é possível relacionar este aumento do número de palha em *C.*

intermedia com a perda de viabilidade dos grãos de pólen causada pelo armazenamento das políneas.

Figura 16- Porcentagem de sementes sem embrião (palha) nas amostras de *Cattleya kautskyana* e *C. intermedia* fecundadas por políneas conservadas em diferentes condições de umidade e temperatura.

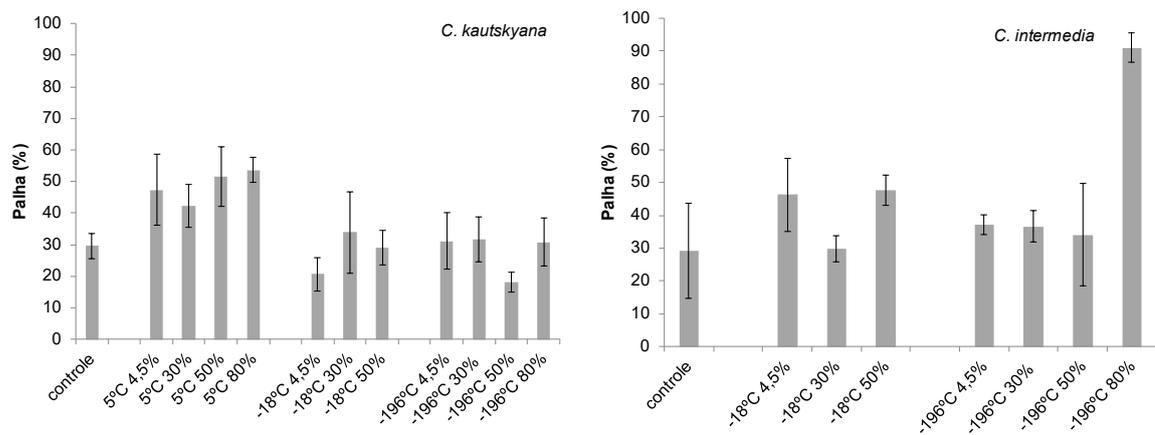
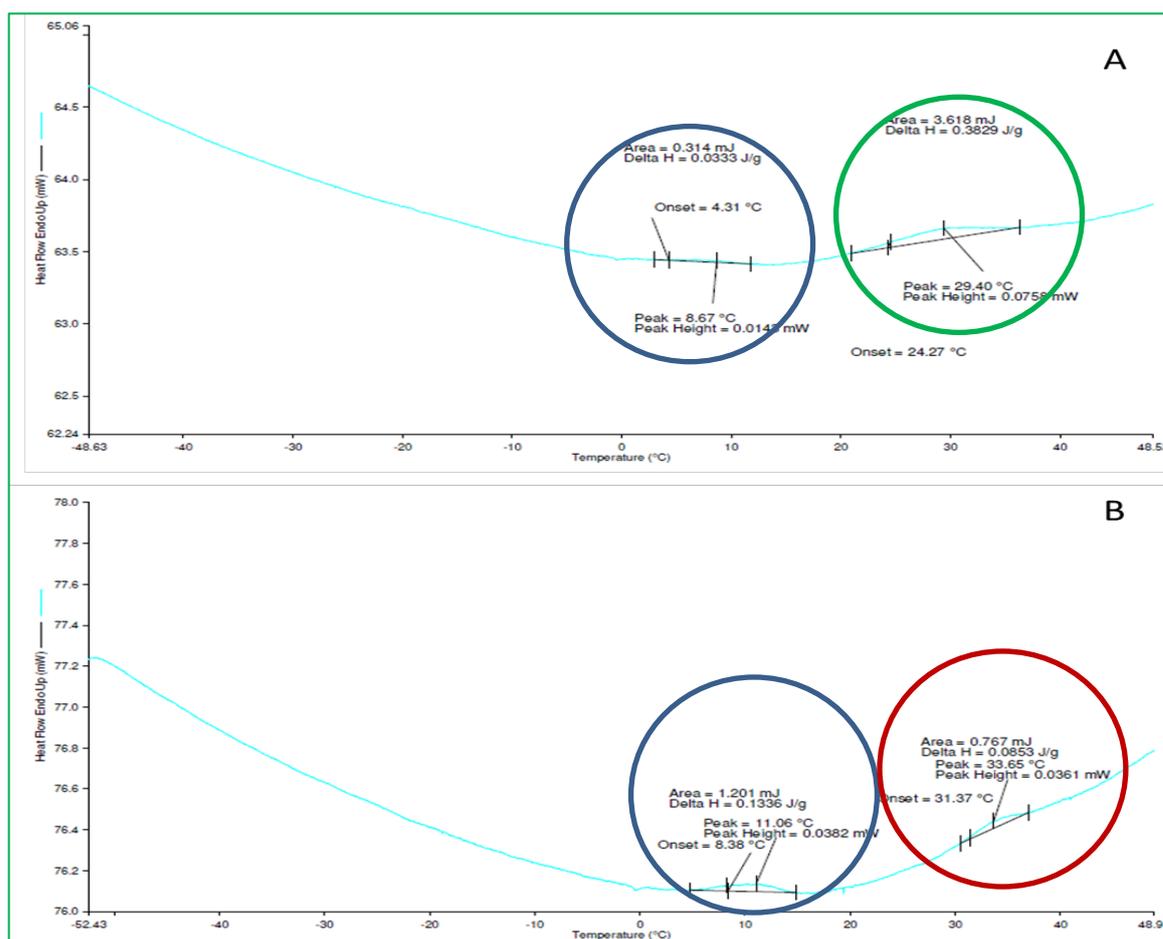


Figura 17- Varredura calorimétrica diferencial (DSC) de políneas de *Cattleya intermedia* (A) e de *Cattleya kautskyana* (B). Circulos azuis - ácido láurico (12C:0), círculo verde – ácido palmítico (16C:0) e círculo vermelho – ácido esteárico (18C:0).



Nota-se na figura 17 que há a presença de lipídeos saturados nas amostras de *C. intermedia* (A) e *C. kautskyana* (B) provavelmente, estimados pelos pontos de fusão (PF); ácidos láurico nas duas amostras, PF de 8,5 °C, ácido palmítico em *C. intermedia*, PF 29,4 °C e ácido esteárico em *C. kautskyana*, PF de 33,6 °C, mas em concentrações diferentes, sendo que em políneas de *C. kautskyana* apresentou uma maior concentração do ácido láurico, e *C. intermedia* uma alta concentração de ácido palmítico, o que ajudaria a explicar o comportamento da curvas de sorção (FIGURA 3).

6 DISCUSSÃO

Estudos sobre armazenamento de políneas de orquídeas ainda são escassos, dessa forma, há necessidade de que cada vez mais trabalhos sejam realizados para aumentar a gama de informações necessárias de forma a promover possibilidades mais efetivas de conservação dessas plantas. Quando estudamos orquídeas, é preciso levar em consideração o tamanho da família (GOVAERTS *et al.*, 2016), a quantidade de gêneros, espécies e os diferentes habitats que fazem com que estas plantas apresentem respostas distintas quando submetidas aos mesmos testes e tratamentos, portanto, dificilmente haverá generalizações se tratando de estudos com esse grupo de plantas.

6.1 Teor de Umidade e Temperatura no Armazenamento de Políneas

As curvas de sorção de água das políneas de *C. kautskyana* e *C. intermedia* (FIGURA 3) demonstraram que o teor de água sugere que as mesmas tenham composição lipídica, similarmente ao que foi demonstrado por Custódio *et al.* (2020) em políneas de *Dactylorhiza fuchsii* e *Disa uniflora*, mesmo com diferenças significativas entre as espécies, em umidade relativa próxima a 100%, as amostras expostas não absorveram água suficiente para que seu conteúdo fosse igual ou superior a 30% e dessa forma, de acordo com a classificação de PDP e PHP pelo teor de água nas políneas (NEPI; FRANCHI; PADNI 2001; FRANCHI *et al.*, 2002; PACINI; HESSE, 2002; FRANCHI *et al.*, 2011), as espécies estudadas comportaram-se como parcialmente desidratadas (PDP), e logo, tolerantes a dessecação, processo importante para o sucesso do armazenamento, e podem ser classificadas como ortodoxas (PACINI; GUARNIERI; NEPI, 2006). As espécies *Disa uniflora* e *Dactylorhiza fuchsii* apresentaram tolerância a dessecação e teor de água inferior a 30% em políneas, demonstrando comportamento ortodoxo (CUSTÓDIO *et al.*, 2020).

Além disso, a capacidade de desidratação e reidratação, logo, a variação de tamanho e forma, promovida pela presença de sulcos (FRANCHI *et al.*, 2011), e a alta taxa de sobrevivência das políneas após a antese, que pode durar dias ou até semanas até atingir o estigma, aguardando a maturação do gametófito feminino (FRANCHI *et al.*, 2002), são características que reforçam a hipótese de que os grãos

de pólen de *C. kautskyana* e *C. intermedia* são ortodoxos. Além disso, essas condições reiteram a possibilidade do armazenamento *ex situ* (MARK; SEATON; PRITCHARD, 2014).

Antes de ser armazenado, o material necessita passar pelo processo de dessecação pois evita a formação de cristais de gelo que podem romper a membrana celular do pólen (ALMEIDA, 2011). Sendo assim, para preservar a viabilidade dos materiais biológicos é necessária sua transformação de fluídos para sólidos (BALLESTEROS *et al.*, 2018). Isso pode ser mais facilmente atingido em materiais com teores de lipídeos elevados, o que é sugerido pelas curvas de sorção das políneas (Figura 3).

A possibilidade de armazenamento em temperaturas abaixo de zero sem o uso de crioprotetores (CARVALHO, 2006; VENDRAME *et al.*, 2008), sugere que as políneas, assim como as sementes, passem pelo processo de vitrificação naturalmente quando expostas a essas condições, devido presença de açúcares e proteínas do tipo LEA (MARCOS FILHO, 2005) e possivelmente encontradas em grãos de pólen de orquídeas, como registrado em outras espécies vegetais (TAIZ; ZEIGER, 2017).

A combinação de teor de água reduzido nas políneas e temperaturas mais baixas possibilita que esse material seja estocado por um período maior, mantendo a viabilidade e melhorando a longevidade (SEATON *et al.*, 2018). Observamos que, para as espécies estudadas, mesmo com políneas armazenadas após um ano com teores superiores aos relatados na literatura (>15%), foi possível a formação de cápsulas com sementes viáveis e altas porcentagens de germinação para quase todos os tratamentos, principalmente para *C. kautskyana*. Esse dado também pode ser explicado através do tempo em que as políneas de cada espécie se mantêm viáveis na natureza após a antese das flores. As políneas de *C. kautskyana*, por exemplo, devem se manter viáveis por períodos maiores, uma vez que suas flores não oferecem recompensa aos polinizadores dificultando assim a visita e, conseqüentemente, o processo de polinização. Dessa maneira, as políneas necessitam ser mais resistentes quanto ao ambiente para que ao serem depositadas pelo polinizador no estigma de outra flor, estejam hábeis em fertilizar as flores e formar cápsulas com sementes viáveis. Ao contrário, *C. intermedia* é caracterizada como espécie recompensadora e seus polinizadores, coincidentemente, visitam as flores no horário de emissão de fragrâncias florais, entre 9h e 14h, sugerindo a

busca por néctar (CABALLERO-VILLALOBOS *et al.*, 2017). Sendo assim, suas políneas chegam mais rapidamente em outras flores, logo tenderiam a não se manter viáveis por muito tempo. Tal tipo de estratégia é similar a encontrada por Custódio *et al.* (2020) onde *Dactylorhiza fuchsii* uma espécie multiflora, que cresce em grandes populações e tem flores que não oferecem recompensa e apresentam políneas menos tolerantes ao armazenamento, e *Disa uniflora* uma espécie que oferece recompensa e cresce em pequenos grupos de plantas e que apresentam políneas com alta tolerância ao ambiente.

As amostras de políneas de *C. intermedia* equilibradas a 30, 50 e 80% UR demonstraram-se tolerantes, principalmente, quando armazenadas à -196 °C. Enquanto *C. kautskyana* foi mais sensível à UR, obtendo melhores resultados de germinação em 30 e 50%, porém, apresentou maior capacidade de armazenamento, podendo ser facilmente estocada em -18 e -196 °C.

Em armazenamentos com temperaturas mais altas, a viabilidade do material tende a diminuir, uma vez que entram em processo natural de deterioração (MARCOS FILHO, 2005) mais rapidamente, sofrendo alterações físicas, bioquímicas, fisiológicas (CUSTÓDIO, 2005), tornando os danos irreversíveis. Por outro lado, Ballesteros *et al.* (2018) enfatizam que a deterioração continua mesmo em temperaturas baixas, porém em taxas mais lentas, reguladas pela mobilidade molecular. Em razão disso, o armazenamento em temperaturas extremamente baixas, como nitrogênio líquido (-196 °C) é o mais indicado para a conservação a longo prazo. De acordo com Carvalho (2006) e Vendrame *et al.* (2008), o armazenamento de políneas em condições de criopreservação foram eficientes para orquídeas do gênero *Dendrobium*, gerando sementes viáveis, além disso, o uso de crioprotetores para diminuir os danos não foi necessário, uma vez que as políneas foram bem conservadas apenas em imersão no nitrogênio líquido.

Apesar da qualidade inicial das políneas de *C. intermedia* ser superior as de *C. kautskyana*, observamos que as sementes formadas de nesta última apresentaram maior viabilidade e germinação, além de terem sido formadas cápsulas com sementes viáveis na maior parte dos tratamentos, inclusive no armazenamento a 5 °C. *C. intermedia* demonstrou necessidade de um maior controle de umidade e temperatura para o armazenamento, no entanto, foi possível a formação de sementes viáveis, principalmente através de políneas armazenadas a -196 °C. Dessa forma, é importante ressaltar que para o armazenamento ser

considerado eficaz, independente dos diferentes níveis de germinação de pólen, a qualidade das sementes geradas através da fertilização usando pólen armazenado tem que se sobressair (MARKS; SEATON; PRITCHARD, 2014).

De acordo com os resultados obtidos para as duas espécies, a eficácia do armazenamento, principalmente em temperaturas ultrabaixas, possibilitará a criação de bancos de germoplasma com a finalidade de conservação. Marks, Seaton e Pritchard (2014) verificaram o sucesso no armazenamento de políneas de quatro espécies de orquídeas terrestres nativas do Reino Unido, apresentando longevidade cinética semelhante a detectada em sementes. Em espécies de orquídeas mediterrâneas, Bellusci *et al.* (2010) observaram a capacidade prolongada de germinação *in vitro*, fertilização e desenvolvimento de sementes embrionadas. Isso sugere que, aliado a um armazenamento adequado, as políneas podem apresentar longos períodos de longevidade e serem usadas para a fertilização, e posteriormente, obtenção de novas plantas.

Considerando o armazenamento de políneas demonstrados neste estudo e de sementes de *C. kautskyana* (HENGLING *et al.*, 2020) e *C. intermedia* (dados ainda não publicados), foi possível observar que ambos foram tolerantes à dessecação, logo, obtiveram sucesso quanto ao armazenamento, tendo êxito na avaliação da qualidade das sementes através de testes de germinação e tetrazólio, o que leva a conclusão de que essas sementes são capazes de gerar plântulas saudáveis. A partir desses resultados, o pólen e as sementes de *C. kautskyana* e *C. intermedia* demonstraram correspondência quanto as exigências para classificá-los, ambos, como ortodoxos, já que foram tolerantes à dessecação e mantiveram sua viabilidade quando armazenados em condições abaixo de zero, diferente do observado por Franchi *et al.* (2011) que ressaltou a diferença de comportamento entre pólen e sementes de orquídeas quanto à dessecação, classificando-os como recalcitrante e ortodoxo, respectivamente.

6.2 Polinização, pegamento e formação de cápsulas de sementes

Após os doze meses, as políneas armazenadas foram utilizadas para a fazer a polinização de uma nova florada e, posteriormente, as sementes oriundas deste evento foram avaliadas. Inicialmente o pegamento de ovários após alguns dias da polinização foi feito, observando-se a murcha das peças florais e o intumescimento

do ovário quando o processo obteve sucesso. Além da viabilidade das políneas, as condições ambientais também podem interferir no pegamento e na formação de cápsulas de plantas. As plantas de *C. kautskyana* apresentaram altas porcentagens de pegamento e formação de cápsulas para quase todos os tratamentos, demonstrando que mesmo com políneas com menor viabilidade, o processo de polinização foi eficiente. Ao contrário, *C. intermedia* apresentou menor eficiência no pegamento e um déficit maior ainda na formação de cápsulas de sementes, reduzindo, consideravelmente, a quantidade de material adquirido para avaliação. É possível visualizar esse acontecimento claramente uma vez que não houve formação de cápsulas em políneas armazenadas à 5 °C. Além da redução de cápsulas, *C. intermedia* ainda apresentou períodos de maturações mais longos.

A viabilidade das políneas de *C. intermedia* foi diretamente afetada pelo armazenamento ao longo de um ano. Em 5 °C, as políneas apresentaram baixa viabilidade após os 120 dias de avaliação em todas as umidades testadas, sendo assim, a temperatura mais elevada foi prejudicial para conservar essas amostras. Já nas temperaturas sub zero (-18 e -196 °C), as políneas tiveram maior viabilidade ao final das avaliações, porém, demonstraram ser afetadas por longos períodos de armazenamento, uma vez que as taxas de pegamento e formação de cápsulas foram mais prejudicadas. Embora suas políneas tenham apresentado tolerância à dessecação, observamos que longos períodos de armazenamento talvez não seja o mais indicado para essa espécie.

6.3 Viabilidade de Políneas e de Sementes e Formação de Palha

A viabilidade das políneas é um fator essencial para dar início ao armazenamento, porém não é o único a ser levado em consideração. Os dados apresentados neste estudo confirmam que o sucesso do armazenamento se dá, principalmente, pela capacidade das plantas polinizadas com amostras armazenadas em formarem cápsulas com sementes viáveis e com habilidades germinativas para, então, originarem novas plântulas.

Observamos que as políneas de *C. intermedia* apresentaram viabilidade superior às políneas de *C. kautskyana* durante o período de avaliação enquanto estavam armazenadas (FIGURAS 7, 8, 9 e 10). Mas após o processo de polinização e maturação foram registradas mais cápsulas de *C. kautskyana* do que *C.*

intermedia (FIGURA 11), além de registrado maior percentual de viabilidade das sementes (FIGURA 12). Esse dado valida a afirmação de que é necessária a avaliação das sementes para afirmar a eficiência ou não do armazenamento proposto.

Através dos dados obtidos, consideramos eficazes as respostas *C. kautskyana* aos tratamentos propostos para o armazenamento. Nos tratamentos em que as políneas foram armazenadas à 5 °C, que é considerada uma temperatura alta e pouco eficiente para desacelerar o processo de deterioração por longos períodos, obtivemos sementes com alta viabilidade (>80%) em todas as umidades testadas (FIGURA 12), além de taxas de germinação final superiores à 70% (FIGURA 13). Nas demais temperaturas (-18 e -196 °C), consideradas como ideais para armazenamento por longos períodos (WALTERS *et al.*, 2004; CARVALHO, 2006; VENDRAME *et al.*, 2008; MARKS; SEATON; PRITCHARD, 2014; SEATON, *et al.*, 2018; CUSTÓDIO *et al.*, 2020), as políneas armazenadas de *C. kautskyana* também foram capazes de gerar sementes com elevadas taxas de viabilidade e de germinação final das sementes, com exceção das plantas fertilizadas com políneas equilibradas em 80% de umidade relativa do ar e -18 °C que não formaram cápsulas.

Através da quantidade de palha nas cápsulas coletadas também é possível observar os efeitos do armazenamento, principalmente, quando à temperatura em que as amostras foram expostas. As cápsulas formadas de políneas armazenadas à 5 °C, para *C. kautskyana*, foram as que apresentaram maior porcentagem de palha comparando com o controle e as outras condições de armazenamento sub zero. Por outro lado, *C. intermedia*, que não apresentou cápsulas de políneas armazenadas a 5 °C, apresentando um percentual de palha superior à *C. kautskyana* nos armazenamentos de -18 e -196 °C (FIGURA 16), confirmando mais uma vez sua maior sensibilidade a esse tipo de estratégia de conservação de germoplasma.

7 CONCLUSÃO

As políneas de *C. intermedia* e *C. kautskyana* foram classificadas como PDP, uma vez que apresentam teor de água abaixo de 30% na antese, sendo, portanto, ortodoxas, e tolerantes à dessecação e baixas temperaturas.

Houve diferenças entre a composição lipídica das políneas e *Cattleya intermedia* apresentou alto teor de lipídeos, e com altos teores de ácidos graxos saturados implicando em baixa capacidade de armazenamento. A criopreservação a -196 °C foi melhor para ambas as espécies, mas a UR de equilíbrio pode ser diferente.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, C.; AMARAL, A. L.; BARBOSA NETO, J.F.; SERENO, M.J.C.M. Conservação e germinação *in vitro* de pólen de milho (*Zea mays* subsp. *mays*). **Brazilian Journal of Botany**, v. 34, n. 4, 2011.
- ALVIM, P. O. **Viabilidade e conservação de grãos de pólen de milho**. 2008. 54f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.
- BALLESTEROS, D.; HILL, L. M.; LYNCH, R. T.; PRITCHARD, H. W.; WALTERS, C. Longevity of preserved germplasm: the temperature dependency of aging reactions in glassy matrices of dried fern spores. **Plant and Cell Physiology**, v. 60, n. 2, p. 376-392, 2018.
- BELLUSCI, F.; MUSACCHIO, A.; STABILE, R.; PELLEGRINO, G. Differences in pollen viability in relation to different deceptive pollination strategies in Mediterranean orchids. **Annals of Botany**, v. 106, p. 769–774, 2010.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. **Regras para análises de sementes**. Brasília: SNAD/DNDV/CLAV, 2009.
- CABALLERO-VILLALOBOS, L.; SILVA-ARIAS, G.A.; BUZATTO, C.R.; NERVO, M.H.; SINGER, R.B. Generalized food-deceptive pollination in four *Cattleya* (Orchidaceae: Laeliinae) species from Southern Brazil. **Flora**, v. 234, p. 195-206, 2017.
- CARVALHO, V. S. **Criopreservação de sementes e pólen de orquídeas**. 2006. 69f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.
- CATTLEYA SOURCE**. 2008. Disponível em: <http://cattleya.wikidot.com>. Acesso em: 05 fev. 2020.
- CHASE, M.W.; BARRET, R.L.; CAMERON, K.N.; FREUDENSTEIN, J.V. DNA data and Orchidaceae systematics: a new phylogenetic classification. In: Dixon, K.M. (Ed.). **Orchid Conservation, natural history publications**. Sabah, Malaysia: Kota Kinabalu, 2003. p. 69-89.
- CUSTÓDIO, C.C. Testes rápidos para avaliação do vigor de sementes: uma revisão. **Colloquium Agrariae**, v. 1, n. 1, p. 29-41, 2005.
- ENGELMANN, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 47, n. 1, p. 5-16, 2011.
- FAY, M.F.; CHASE, M.W. Orchid biology: from Linnaeus via Darwin to the 21st century, **Annals of Botany**, v. 104, n. 3, p. 359-364, 2009.
- FERREIRA, C.A. *et al.* Conservação e Determinação da Viabilidade de Grão de Pólen de Milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 6, n. 2, p. 159-173, 2007.

FERREIRA, D.F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**, v.6, n.2, p.36-41, 2008.

FILETI, J.F. **Deterioração controlada em sementes de orquídeas**. 2015. 46f. Dissertação (Mestrado) – Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, 2015.

FLORA DO BRASIL. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. 2020. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB11329>. Acesso em: 15 Jan. 2020

FRANCHI, G.G.; NEPI, M.; DAFNI, A.; PACINI, E. Partially hydrated pollen: taxonomic distribution, ecological and evolutionary significance. **Plant Systematics and Evolution**, v. 234, n. 1-4, p. 211-227, 2002.

FRANCHI, G.G.; NEPI, M.; MATTHEWS, M.L.; PACINI, E. Anther opening, pollen biology and stigma receptivity in the long blooming species, *Parietaria judaica* L. (Urticaceae). **Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, v. 202, n. 2, p. 118-127, 2007.

FRANCHI, G.G.; PIOTTO, B.; NEPI, M.; BASKIN, C.C.; BASKIN, J.M.; PACINI, E. Pollen and seed desiccation tolerance in relation to degree of developmental arrest, dispersal, and survival. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 15, p. 5267-5281, 2011.

GOVAERTS, R.; BERNET, P.; KRATOCHVIL, K.; GERLACH, G.; CARR, G.; ALRICH, P. **World Checklist of Orchidaceae**. Kew: Facilitated by the Royal Botanic Gardens, 2016.

HAY, F.R.; ADAMS, J.; MANGER, K.; PROBERT, R. The use of non-saturated lithium chloride solutions for experimental control of seed water content. **Seed Science and Technology**, v. 36, n. 3, p. 737-746, 2008.

HAY, F.R.; MERRITT, D.J.; SOANES, J.A.; DIXON, K.W. 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.; GIANETI, T.M.; HOSOMI, S.T.; MACHADO-NETO, N.B.; CUSTÓDIO, C.C. Storage of Brazilian *Cattleya* seeds from diverse biomes: lipid composition and effects on germination. **Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology**, (just-accepted), p.1-16, 2020.

HOSOMI, S.T.; SANTOS, R.B.; CUSTODIO, C.C.; SEATON, P.T.; MARKS, T.R.; MACHADO-NETO, N.B. Pre-conditioning *Cattleya* seeds to improve the efficacy of the tetrazolium test for viability. **Seed Science Technology**, v. 39, n. 1, p. 178-189, 2011.

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

MACHADO-NETO, N.B.; CUSTÓDIO, C.C. A medium for non-commercial sowing of orchid seed. **Selbyana**, v.26, p.316-317, 2005.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: Fealq, 2005.

MARKS, T.R., SEATON, P.T., PRITCHARD, H.W. Desiccation tolerance, longevity and seed-siring ability of entomophilous pollen from UK native orchid species. **Annals of Botany**, v. 114, n. 3, p. 561-569, 2014.

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.

NEPI, M.; FRANCHI, G. G.; PADNI, E. Pollen hydration status at dispersal: cytophysiological features and strategies. **Protoplasma**, v. 216, n. 3-4, p. 171, 2001.

NEPI, M.; PACINI, E. Pollination, pollen viability and pistil receptivity in *Curcubita pepo*. **Annals of Botany**, v. 72, n. 6, p. 527-536, 1993.

NIKISHINA, T.V.; POPOV, A.S.; KOLOMEITSEVA, G.L.; GOLOVKIN, B.N. Cryopreservation of seeds of some tropical orchids. **Doklady Biochemistry and Biophysics**, v. 378, n. 1, p. 231-233, 2001.

NIKISHINA, T.V.; POPOVA, E.V.; VAKHRAMEEVA, M.G.; VARLYGINA, T.I.; KOLOMEITSEVA, G.L.; BUROV, A.V.; POPOV, A.S. Cryopreservation of seeds and protocorms of rare temperate orchids. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 54, n. 1, p. 121-127, 2007.

PABST, G.F.J.; DUNGS, F. **Orchidaceae Brasilienses**. Hildesheim: Brucke. 1975. v. 1.

PACINI, E.; HESSE, M. Types of pollen dispersal units in orchids, and their consequences for germination and fertilization. **Annals of Botany**, v. 89, p. 653-664, 2002.

PACINI, E.; GUARNIERI, M.; NEPI, M. Pollen carbohydrates and water content during development, presentation, and dispersal: a short review. **Protoplasma**, v. 228, n. 1-3, p. 73, 2006.

PANSARIN, E.R. Biologia reprodutiva e polinização em *Epidendrum paniculatum* Ruiz & Pavón (Orchidaceae). **Brazilian Journal of Botany**, v. 26, n. 2, 2003.

PASQUAL, M.; PETRI, J.L.; MATTOS, C.S. Polinização da macieira III. Cultivares BR-1 e Mollies Delicious. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 17, n. 10, p. 1477-1481, 1982.

PEREIRA, D.A.; BRASILEIRO, B.P.; AMARAL, C.L.F. Termos da biologia da polinização aplicados à fruticultura. **Biotemas**, v. 22, n.1, p. 141-146, 2009.

PIO, L.A.S. **Viabilidade do pólen de citrus em diferentes condições de armazenamento**. 2003. 45f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

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

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia vegetal**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 477-496.

RODRIGUES, V. T. **Orchidaceae Juss**: aspectos morfológicos e taxonômicos. São Paulo, 2011.

SANTOS NETO, O.D.; KARSBURG, I.V.; YOSHITOME, M.Y. Viabilidade e Germinabilidade Polínica de Populações de Jurubeba (*Solanum paniculatum* L.)¹. **Revista de Ciências Agro-Ambientais**, v. 4, n. 1, p 67-74, 2006.

SCHNEIDERS, D.; PESCADOR, R.; BOOZ, M.R.; SUZUKI, R.M. Germinação, crescimento e desenvolvimento in vitro de orquídeas (*Cattleya* spp., Orchidaceae). **Revista Ceres**, v. 59, n. 2, p. 185-191, 2012.

SEATON, P.T.; HOSOMI, S.T.; CUSTÓDIO, C.C.; MARKS, T.R.; MACHADO-NETO, N.B.; PRITCHARD, H.W. Orchid seed and pollen: a toolkit for long-term storage, viability assessment and conservation. *In*: **Orchid Propagation: from laboratories to greenhouses—methods and protocols**. New York: Humana Press, 2018. p. 71-98.

SEATON, P.T.; PRITCHARD, H.W. Orchid germplasm collection, storage and exchange. *In*: DIXON, K.W.; KELL, S.P.; BARRETT, R.L.; CRIBB, P.J. (eds.) **Orchid Conservation**. Kota Kinabalu: Natural History Publications (Borneo), 2003. p. 227-258.

SEATON, P.T.; PRITCHARD, H.W.; MARKS, T.R. Aspects of orchid conservation: seed and pollen storage and their value in re-introduction projects. **Universal Journal of Plant Science** v. 3, n. 4, p. 72-76, 2015.

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

SOUSA, V.R. **Biologia floral do cerrado: polinização e floração**. 2002. 43f. Monografia (Trabalho de Graduação) – Faculdade de Ciências da Saúde do Centro Universitário de Brasília, Brasília, 2002.

SOUZA, V.A.; SCHEMBERG, E.A.; AGUIAR, A.V. Germinação *in vitro* do pólen de jerivá (*Syagrus romanzoffiana* (S.) Cham). **Scientia Forestalis**, v. 38, n. 86, p. 147-151, 2010.

SPRAGUE, J.R.; JOHNSON, V.W. Extraction and storage of loblolly pine (*Pinus taeda*) pollen. *In*: SOUTHERN FOREST TREE IMPROVEMENT CONFERENCE, 14. **Proceedings [...]**. Eastern Tree Seed, Macon, p.20-27, 1977.

STANLEY, R.G.; LINSKENS, H.F. **Pollen: biology, biochemistry and management**. New York: Springer Verlag, 1974. 172p.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2017.

TIGHE, M.E. Manual de recolección y manejo de polen de pinos tropicales y subtropicales procedentes de rodales naturales. **Camcore**, 2004. Disponível em: <http://www.camcore.org/publications/documents/PollenHandbookSpanish.pdf>

TOWILL, L.E. Germplasm preservation. *In*: TRIGIANO, R.N.; GRAY, D.J. (eds). **Plant tissue culture concepts and laboratory exercises**. Boca Raton: CRC Press, 2000. p. 337-353.

TREMBLAY, R.L. Frequency and consequences of multi-parental pollinators of *Cypripedium calceolus* var. *pubescens* (Orchidaceae). **Lindleyana**, v. 9, n. 3, p. 161-167, 1994.

VAN DEN BERG, C. New combinations in the genus *Cattleya* Lindl. (Orchidaceae). **Neodiversity**, v. 3 p. 3-12, 2008.

VENDRAME, W.A.; CARVALHO, V.S.; DIAS, J.M.M.; MAGUIRE, I. Pollination of *Dendrobium* hybrids using cryopreserved pollen. **HortScience**, v. 43, n. 1, p. 264-267, 2008.