

DETERIORAÇÃO CONTROLADA EM SEMENTES DE ORQUÍDEAS

JÉSSICA FONTES FILETI

DETERIORAÇÃO CONTROLADA EM SEMENTES DE ORQUÍDEAS

JÉSSICA FONTES FILETI

Dissertação apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Agronomia - Área de Concentração: Produção Vegetal

Orientador: Nelson Barbosa Machado Neto

635.933 37 Fileti, Jéssica Fontes.
F481d Deterioração controlada em sementes de orquídeas /
Jéssica Fontes Fileti.– Presidente Prudente, 2015.
46f.: il.

Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade
do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP,
2015.

Bibliografia.
Orientador: Nelson Barbosa Machado Neto

1. Envelhecimento. 2. *Orchidaceae*. 3. *Cattleya*. I.
Título.

JÉSSICA FONTES FILETI

DETERIORAÇÃO CONTROLADA EM SEMENTES DE ORQUÍDEAS

Dissertação apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Agronomia – Área de Concentração: Produção Vegetal

Presidente Prudente, 04 de agosto de 2015

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Nelson Barbosa Machado Neto
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente - SP

Prof^a. Dr. Ricardo Tadeu Faria
Universidade Estadual de Londrina - UEL
Londrina – PR

Prof^a. Dr^a. Fabiana Lima Abrantes
Universidade do Oeste Paulista - Unoeste
Presidente Prudente - SP

DEDICATÓRIA

Dedico a todos aqueles que acreditaram e me apoiaram incessantemente durante todas as etapas para a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Nelson Barbosa Machado Neto pelos ensinamentos e compreensão.

Aos professores Silvério Takao Hosomi e Ceci Castilho Custódio pela colaboração e apoio durante a realização do trabalho.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Unoeste.

Aos funcionários dos laboratórios de Cultura de Células e Tecidos Vegetais, Sementes e Genética Molecular da Unoeste.

Aos colegas e professores de laboratório: Alessandra, Santista, Cris, Joice, Mariane, Alyne, Lu, Edna, Fabi e as queridas “tias da limpeza” Ro e Lu.

Aos ex-alunos de graduação do Curso de Agronomia, Rafaelle e Leonardo, pela disposição e companhia no laboratório.

Aos meus amigos, Rebeca, Camila, Johnny, Juliano, Amarildo e Luciana Derré pelo apoio e confiança em todos os momentos.

À toda a minha “grande” família, que sempre acreditou na minha competência e força para seguir realizando meus sonhos. Em especial: Karina (mãe), Mauro (pai), Andressa (“boadrasta”), Ro, Karol, Ju e Zé (irmãos).

Em especial ao meu noivo, Heitor, por todo apoio, compreensão e dedicação durante todo esse tempo.

Muito obrigada!

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

RESUMO

Deterioração controlada em sementes de orquídeas

Sementes de orquídeas são diminutas e constituídas em grande parte por lipídeos, o que as torna um modelo ideal para estudos de deterioração, uma vez que grandes populações podem ser trabalhadas em pequenas amostras. A deterioração controlada é um tratamento que apresenta controle do teor de água das sementes durante o envelhecimento. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da deterioração controlada sobre sementes de orquídeas. Este trabalho foi conduzido pela primeira vez em cinco espécies de orquídeas: *Cattleya brevicaulis*, *C. tenebrosa*, *C. amethystoglossa*, *C. tigrina* e *Encyclia granítica* submetidas a três temperaturas 41, 43 e 45°C durante os períodos de 0, 1, 3, 6, 9, 15, 24 e 48 horas. As variáveis de germinação total, índice de velocidade de germinação (IVG), teste de tetrazólio, além dos testes bioquímicos como acúmulo de Malondialdeído (MDA), atividade enzimática de Superóxido Dismutase (SOD) e Peroxidase (PRX), foram avaliadas. Os resultados foram mais expressivos a partir de 15 horas de exposição às temperaturas de 43 e 45°C. A germinação total, o IVG e o teste de tetrazólio apresentaram decréscimos com o aumento da deterioração controlada para todas as espécies. *Cattleya tigrina* e *C. tenebrosa* apresentaram incrementos expressivos de MDA após 48 h de deterioração controlada, ao contrário de *C. amethystoglossa*, *C. brevicaulis* e *Encyclia granítica*. A atividade enzimática das duas enzimas testadas (SOD e PRX) apresentaram decréscimos nas três temperaturas. A germinação total, o IVG e o teste de tetrazólio foram mais eficientes para detectar as variações de viabilidade e vigor nas sementes deterioradas.

Palavras-chave: Envelhecimento, *Orchidaceae*, *Cattleya*, Banco de Sementes.

ABSTRACT

Controlled deterioration in orchid seeds

Orchid seeds are the smallest and rich in lipids, which turn them in an ideal model to deterioration studies as large populations can be worked in small samples. Controlled deterioration (CD) is a procedure that uses a control in the seed water content during ageing process. The objective of this work was to verify the controlled deterioration effect over orchid seeds. This work was done by the first time with five tropical orchid species: *Cattleya brevicaulis*, *C. tenebrosa*, *C. amethystoglossa*, *C. tigrina* and *Encyclia granitica* submitted to three temperatures 41, 43 and 45°C during the periods of 0, 1, 3, 6, 9, 15, 24 and 48 hours. The variables Total germination, Germination Velocity Index (GVI), Tetrazolium test, MDA content, SOD and PRX activities were evaluated. Results were more expressive after 15 horas of exposition to temperatures of 43 and 45°C. Total germination, GVI and Tetrazolium test exhibited decreases with the increase in the controlled deterioration. *Cattleya tigrina* and *C. tenebrosa* showed expressive increase of MDA content after 48h of controlled deterioration, the other species (*C. amethystoglossa*, *C. brevicaulis* and *Encyclia granitica*) did not. Enzyme activities (SOD and PRX) showed decreases in all temperatures. Total germination, GVI and Tetrazolium test were more efficient to detect variations in the aged seeds.

Key words: Ageing, Orchidaceae, *Cattleya*, Seed Bank.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Representação em fotos da germinação de sementes de *C. brevicaulis* no período de avaliação21
- Figura 2: Representação em foto do teste de Tetrazólio com pré-condicionamento em sementes de *C. brevicaulis*.....22
- Figura 3: Porcentagens de viabilidade por tetrazólio de cinco espécies de orquídeas submetidas a três temperaturas (41, 43 e 45°C) no ensaio de deterioração controlada.....27
- Figura 4: Porcentagem de germinação de sementes de *C. brevicaulis* submetidas a três temperaturas (41, 43 e 45°C) no ensaio de deterioração controlada. .28
- Figura 5: Porcentagem de germinação de sementes de *C. tigrina* submetidas a três temperaturas (41, 43 e 45°C) no ensaio de deterioração controlada.29
- Figura 6: Porcentagem de germinação de sementes de *C. tenebrosa* submetidas a três temperaturas (41, 43 e 45°C) no ensaio de deterioração controlada. .30
- Figura 7: Porcentagem de germinação de sementes de *C. amethystoglossa* submetidas a três temperaturas (41, 43 e 45°C) no ensaio de deterioração controlada.....31
- Figura 8: Porcentagem de germinação de sementes de *E. granitica* submetidas a três temperaturas (41, 43 e 45°C) no ensaio de deterioração controlada. .32
- Figura 9: Índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de *C. brevicaulis* submetidas a três temperaturas (41, 43 e 45°C) no ensaio de deterioração controlada.....33
- Figura 10: Índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de *C. tigrina* submetidas a três temperaturas (41, 43 e 45°C) no ensaio de deterioração controlada.....33
- Figura 11: Índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de *C. tenebrosa* submetidas a três temperaturas (41, 43 e 45°C) no ensaio de deterioração controlada.....34
- Figura 12: Índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de *C. amethystoglossa* submetidas a três temperaturas (41, 43 e 45°C) no ensaio de deterioração controlada.....34
- Figura 13: Índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de *E. granitica* submetidas a três temperaturas (41, 43 e 45°C) no ensaio de deterioração controlada.....35
- Figura 14: Quantificação de MDA em sementes de cinco espécies de orquídeas submetidas a três temperaturas (41, 43 e 45°C) no ensaio de deterioração controlada.....36
- Figura 15: Atividade de SOD em sementes de cinco espécies de orquídeas submetidas a três temperaturas (41, 43 e 45°C) no ensaio de deterioração controlada.....37

Figura 16: Atividade de PRX em sementes de cinco espécies de orquídeas submetidas a três temperaturas (41, 43 e 45°C) no ensaio de deterioração controlada.....38

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1	Sementes de orquídeas	14
2.2	Testes de vigor	15
2.3	Deterioração de sementes	16
2.3.1	Respiração e síntese de ATP	17
2.3.2	Alterações nos sistemas enzimáticos.....	18
2.3.3	Danos ao material genético.....	18
3	MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1	Teste de deterioração	20
3.2	Teste de germinação	21
3.3	Teste de tetrazólio	22
3.4	Quantificação de Malondialdeído (MDA)	22
3.5	Extração de enzimas e análise	23
3.5.1	Superóxido Dismutase (SOD, EC.1.15.11)	23
3.5.2	Peroxidase (PRX, EC. 1.11.1.7).....	24
3.6	Expressão dos resultados	24
3.7	Análise estatística	24
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
5	CONCLUSÕES	41
	REFERÊNCIAS	42

1 INTRODUÇÃO

As orquídeas apresentam, de maneira geral, desenvolvimento lento, desde a germinação das sementes até o estabelecimento de uma planta. Suas sementes apresentam deficiência nutricional, sendo, na natureza, dependentes de fungos micorrízicos para a germinação. Em laboratório, a germinação é realizada *in vitro*, baseada em meios nutritivos e ambiente controlado, livre de patógenos. Nessas condições as sementes dispõem de macro e micronutrientes necessários para germinação e estabelecimento da plântula até serem aclimatizadas em ambiente natural.

A deterioração controlada é um teste realizado para avaliar a qualidade de lotes de sementes, porém, o processo de deterioração ocorre naturalmente de acordo com o seu envelhecimento. Este processo é inevitável para qualquer ser vivo. Em relação às sementes, ocorre diminuição de capacidade germinativa e, conseqüentemente, perda de vigor.

Este teste envolve o controle da umidade das sementes e da temperatura utilizada, e ainda é desconhecido quando se trata de sementes de orquídeas. Para isso é necessária adequação dos procedimentos de acordo com o tamanho das sementes. Além de que, as sementes de orquídeas apresentam grande quantidade de lipídios em sua composição celular agravando os danos causados pela deterioração.

As sementes são submetidas à alta temperatura e umidade relativa por tempo determinado para que possam ter o umedecimento desejado. A umidade desencadeia a germinação das sementes, enquanto a temperatura atua diretamente na velocidade em que as reações irão ocorrer. Desta forma, esses dois fatores demonstram efeitos significativos sobre a atividade enzimática e a utilização de reservas. Pode haver diferenças entre a velocidade de absorção de água em lotes de uma mesma espécie, o que resultará em diferentes intensidades de deterioração. O grau de umidade das sementes é ajustado para, posteriormente, serem submetidas à alta temperatura. Por ter amostras com conteúdo de água semelhante, obtêm-se condições mais uniformes durante o teste e uma padronização mais efetiva. A padronização do teste pode proporcionar diferentes níveis de germinação e vigor entre os lotes.

O crescimento de pesquisas relacionadas aos testes de vigor para avaliar a qualidade fisiológica das sementes teve um aumento significativo ao longo dos anos, pois possibilita objetividade e rapidez em seus procedimentos, além da obtenção de respostas confiáveis.

O teste de deterioração controlada em sementes de orquídeas é inédito, desta forma, poucos são os aspectos semelhantes para comparação. O objetivo do presente trabalho foi aplicar as técnicas de deterioração controlada em sementes de orquídeas, visando o estudo do comportamento fisiológico das espécies de *Cattleya brevicaulis*, *C. tenebrosa*, *C. amethystoglossa*, *C. tigrina* e *Encyclia granitica*. Dessa forma, obtendo um método que permita a caracterização do lote antes da estocagem.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Dentre as Angiospermas, as orquídeas representam o maior grupo com cerca de 26.000 espécies (CHASE et al., 2015), e no Brasil são encontradas cerca de 10% das espécies desse grupo (SOUZA; LORENZI, 2008), além de ocorrer em quase todos os ecossistemas da Terra com exceção da zona polar (NIKISHINA et al., 2001, 2007). Algumas espécies têm grande importância econômica, como *Vanilla planifolia*, da qual é extraída a essência de baunilha; algumas outras espécies possuem alto valor ornamental, como por exemplo, *Cattleya*, *Phalaenopsis*, *Dendrobium*, entre outras (JUDD et al., 2009). A sua intensa exploração tem acarretado extinção de espécies da população, além da degradação do seu habitat natural (HOSOMI et al., 2011). A exploração do habitat também é fator que colabora para o desaparecimento de muitas espécies (KOOPOWITZ, 2001).

2.1 Sementes de orquídeas

Os estudos em orquídeas vêm crescendo gradativamente ao decorrer dos anos. Para fins de conservação, é fundamental o estabelecimento de bancos de sementes de espécies cultivadas e silvestres (ALVAREZ-PARDO; FERREIRA, 2006; SEATON; PRITCHARD, 2008), no entanto, as informações para armazenamento destas são limitadas, e ainda há divergências entre autores quanto as condições mais adequadas (SHOUSHTARI et al., 1994; PRITCHARD; SEATON, 1993; PRITCHARD; POYNTER; SEATON, 1999; MACHADO NETO; CUSTÓDIO, 2005a, SEATON; PRITCHARD, 2008). Algumas podem ter duração curta, apenas três meses, quando armazenadas secas a 4°C (MACHADO NETO; CUSTÓDIO, 2005b), enquanto o armazenamento em temperatura mais baixa (sub-zero, -18°C) é considerado mais adequado para armazenamento em longo prazo (SEATON; PRITCHARD, 2008).

Algumas orquídeas ameaçadas de extinção podem ser propagadas *in vitro* em meio apropriado à partir de sementes (LONG et al., 2010; DUTRA; KANE; RICHARDSON, 2009; ÁVILA-DIAZ et al., 2009, HOSOMI et al., 2012). Porém, esta não é uma estratégia fácil de seguir para todos os taxa. Além disso, as sementes de algumas espécies não podem ser armazenadas em baixa temperatura e umidade,

pois expressam características intermediárias ou recalcitrantes, uma vez que não toleram dessecação, ou armazenamento em condições de câmara fria (MACHADO NETO; CUSTÓDIO, 2005b) por não se apresentarem como ortodoxas clássicas (ELLIS; HONG, 2007). Como alternativa, os bancos de sementes têm o potencial de longo prazo de armazenamento de um grande número de propágulos (IUCN, 1996, MACHADO NETO; CUSTÓDIO, 2005b, MERRIT et al., 2014), o que seria facilitado em orquídeas, pois como as sementes são pequenas, de 0,05 a 6,0 mm de comprimento e de 0,31 a 24 µg de massa, assim, cada cápsula pode conter de centenas a milhões de sementes (ARDITTI; GHANI, 2000). Essas sementes são muito menores do que as estudadas normalmente, dificultando a realização dos mesmos procedimentos e avaliação dos parâmetros.

2.2 Testes de vigor

O conjunto de características que determinam o potencial fisiológico das sementes é denominado vigor. As pesquisas nos últimos 60 anos têm contribuído para testes padronizados para mensuração do vigor envolvendo envelhecimento artificial, testes de frio, condutividade elétrica ou lixiviação de solutos inorgânicos e a determinação das atividades enzimáticas (MATTHEWS et al., 2012). O desenvolvimento destes métodos tem sido facilitado pela automação, captura de imagens e subsequente análise em computadores (MCDONALD; EVANS; BENNETT, 2001; DUTRA; MEDEIROS FILHO, 2008; DELL'AQUILA, 2007, HOSOMI et al., 2011). Este potencial é originado no genótipo, variando a tendência à deterioração para cada espécie. Através desse, características aliadas à qualidade inicial, o teor de água das sementes e as condições ambientais podem retardar ou acelerar o processo de deterioração (SILVEIRA, 2006). Portanto, estes testes são utilizados na identificação de diferenças no potencial fisiológico de lotes que apresentam semelhanças na porcentagem de germinação (DUTRA; MEDEIROS FILHO, 2008), mas que podem ser distintos por uma maior probabilidade de desempenho superior após a semeadura e/ou durante o armazenamento (TORRES, 2005). Sendo assim, os lotes de maior vigor apresentarão maior possibilidade de sucesso em condições adversas (SILVEIRA, 2006).

Destacam-se entre os testes de vigor: o teste de tetrazólio, o envelhecimento acelerado e a deterioração controlada; a diferença entre o envelhecimento acelerado e a deterioração controlada, consiste-se no teor de água das sementes, que no primeiro é variável e no segundo ele é conhecido antes da semente ser submetida à temperaturas mais elevadas. Em ambos os casos estes tratamentos servem para deteriorar as sementes. Segundo Powell e Matthews (1981), a deterioração controlada foi desenvolvida para avaliar a qualidade de sementes pequenas.

2.3 Deterioração de sementes

O envelhecimento da semente é caracterizado por várias alterações físicas, bioquímicas, fisiológicas e citológicas da semente a partir de sua maturidade fisiológica, sendo contínua, progressiva e irreversível (CUSTÓDIO, 2005). Isto será determinado pelo desequilíbrio funcional de tecidos ativos, provocando a inativação progressiva de seu metabolismo até a morte. Nas sementes, a taxa de deterioração depende fundamentalmente da temperatura, umidade relativa do ar e do histórico da população. O termo deterioração indica o início da perda da viabilidade e/ou do vigor das sementes, sendo um processo complexo podendo ser verificado em diferentes graus de intensidade e velocidade (MARCOS FILHO, 2005). A partir desse processo, muitos estudos são feitos com o propósito de desenvolver métodos de determinação do potencial fisiológico dos lotes ou vigor de sementes.

Segundo Delouche (2002), a velocidade e o progresso da deterioração estão diretamente ligados com o aumento da umidade relativa e temperatura que as sementes estão expostas e também de seu histórico genético. Esses problemas podem se agravar através de fatores como: imaturidade da semente e danos mecânicos, por exemplo.

A deterioração varia entre diferentes espécies, entre lotes de cultivares da mesma espécie, entre lotes do mesmo cultivar e entre sementes do mesmo lote. Sendo assim, o retardo ou o avanço da velocidade e intensidade da deterioração dependem da longevidade, da composição química e das diferenças genéticas

juntamente com a qualidade inicial e grau de umidade da semente e às condições do ambiente (MARCOS FILHO, 2005).

2.3.1 Respiração e síntese de ATP

ROS são continuamente produzidos durante o ciclo celular. E em sementes da formação a maturação (BAILLY; EL-MAAROUF-BOUTEAU; CORBINEAU, 2008). O metabolismo primário, aquele responsável por produzir energia, é muito bem regulado e em condições de estresse, esta regulação pode ser perdida e espécies reativas de oxigênio (ROS), como radicais superóxido (O_2^-), radicais hidroxila (OH^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) podem ser produzidas (SCANDALIOS, 1993; SIEGEL, 1993). ROS podem causar reações oxidativas, tendo como consequências o descoramento (“bleaching”) da clorofila e a destruição das membranas por peroxidação lipídica (CATANEO et al. 2005; KRUSE et al., 2006), além de gerar subprodutos tóxicos (ATAÍDE; FLORES; BORGES, 2012) como, por exemplo, etanol, aldeídos, ácidos graxos de cadeias curtas e compostos fenólicos que são produtos secundários da peroxidação lipídica acumuladas durante o processo de deterioração que podem inibir a germinação e afetar o desenvolvimento das plântulas (COLVILLE et al., 2012).

Podem, contudo, servirem de auxiliares durante a germinação uma vez que tanto a falta como o excesso de ROS podem ocasionar variações na germinação, existindo uma faixa de presença destes radicais livres que seria favorável à germinação, sendo determinada janela oxidativa de germinação (BAILLY; EL-MAAROUF-BOUTEAU; CORBINEAU, 2008; LEYMARIE et al., 2012). Assim, o acúmulo de ROS dentro de certos limites seria importante para a quebra da dormência (ORACZ et al., 2007; EL-MAAROUF-BOUTEAU; BAILLY, 2008; LEYMARIE et al., 2012). Por outro lado a peroxidação de lipídeos, desnaturação de enzimas ou proteínas, degradação da membrana celular e danos genéticos, mediada por ROS estão entre as causas do envelhecimento de sementes (MCDONALD, 2004; EL-MAAROUF-BOUTEAU et al., 2011).

2.3.2 Alterações nos sistemas enzimáticos

Com a evolução do processo de deterioração a atividade de enzimas como fosfatases, desidrogenases, peroxidases, entre outras, pode ser reduzida (KRANNER et al., 2010; DEMIRKAYA; DIETS; SIVRITEPE, 2010; DEMIRKAYA, 2013). A atividade enzimática está diretamente relacionada com a viabilidade das sementes, sendo assim, os danos nas enzimas refletem na diminuição de sementes viáveis (PESKE; ROSENTHAL; MEDEIROS ROTA, 2003; DEMIRKAYA; DIETS; SIVRITEPE, 2010; DEMIRKAYA, 2013).

A atividade de enzimas antioxidantes, incluindo a superóxido dismutase (SOD), a peroxidase (PRX), bem como as enzimas do ciclo ascorbato: glutathiona, podem ser componentes nos mecanismos envolvidos em diversos tipos de estresse e altas atividades destas enzimas tem sido encontrada como resposta aos estresses bióticos e abióticos (FOYER; NOCTOR, 2005; KRANNER et al., 2010).

As peroxidases são abundantes em vários organismos com múltiplas isoformas sintetizadas e reguladas por diversos estímulos. Além disso, apresentam importâncias fisiológicas como o controle do crescimento, lignificação, biossíntese da parede celular, como gatilhos para respostas SAR (Systemic Acquired Resistance) (SIEGEL, 1993; BENHAMOU; NICOLE, 1999; JUNG et al., 2000; MCCUE et al., 2000; MACIEL; GOUVÊIA; PASTORE, 2007).

Altas temperaturas e umidade durante o armazenamento contribuem para alterações degenerativas como desestabilização da atividade enzimática, ruptura e perda da integridade de membrana (NAGEL, BÖRNER; 2010), as quais são causadas principalmente pela peroxidação de lipídios devido ao aumento das espécies reativas de oxigênio (LIMA; ABDALLA, 2001; MCDONALD, 2004).

2.3.3 Danos ao material genético

Como consequência da deterioração das membranas pela peroxidação de lipídeos e das proteínas, e conseqüentemente as enzimas, as sementes ficam mais sensíveis aos danos de embebição (POWELL, 1998), o que acarreta mais danos aos sistemas de membranas e enzimáticos promovendo danos que vão afetar as

concentrações de DNA e RNA acarretar danos cromossômicos, decréscimo da síntese de DNA e RNA (EL-MAAROUF-BOU TEAU et al., 2013), mutações, alterações da transcrição e tradução do material genético (ORACZ et al., 2007; EL-MAAROUF-BOU TEAU et al., 2011; KRANNER et al., 2011; EL-MAAROUF-BOU TEAU et al., 2013).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Sementes de cinco espécies de orquídeas brasileiras de diferentes biomas foram utilizadas - *C. brevicaulis* (H. G. Jones) Van den Berg – status NE, *C. tenebrosa* (Rolfe) A. A. Chadwick – status NE, *C. amethystoglossa* Linden&Rchb.f. – status NT, *C. tigrina* A. Rich – status VU e *E. granitica* (Lindl.) Schltr. – status NE, as quais foram obtidas no Orquidário Aurora, no município de Taciba - SP. Destas espécies *C. brevicaulis*, *C. tenebrosa* e *E. granitica* apresentam status NE (não avaliado), *C. amethystoglossa* – status NT (quase ameaçada) e *C. tigrina* status VU (vulnerável) (BARROS et al., 2015).

As cápsulas foram obtidas por polinização cruzada com plantas de diferentes origens. O processo de colheita foi realizado em períodos diferentes para acomodar os diferentes tempos de maturação. Os frutos foram deixados em envelopes de papel fino e mantidos em condições ambientais (45%UR, 22±3°C) até deiscência completa. As sementes de cada espécie foram limpas, colocadas em tubos plásticos sobre uma solução saturada de cloreto de lítio (11% UR) a 22 ±2°C até atingirem o equilíbrio higroscópico, que foi alcançado após uma semana, quando as sementes apresentaram teor de água entre 6,0 a 6,5%. O grau de umidade foi aferido gravimetricamente com três repetições de 20mg colocados em tubos de 200µL e deixados em estufa a 105°C por 24h (BRASIL. Ministério da Agricultura, 2009).

3.1 Teste de deterioração

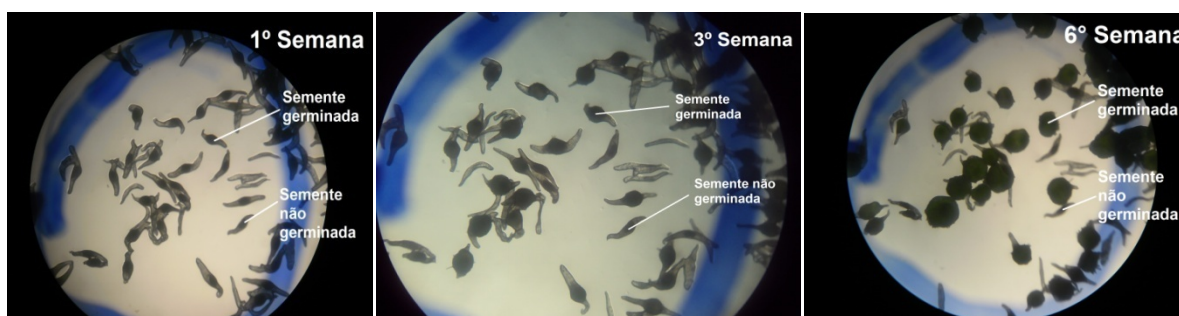
As sementes foram equilibradas a 20% de umidade e divididas em oito sub-amostras, as quais foram condicionadas em microtubos e submetidas às temperaturas de 41, 43 e 45°C por diferentes períodos (zero, 1, 3, 6, 9, 15, 24 e 48 horas). O equilíbrio foi feito através da fórmula da umidade, obtendo a quantidade exata de água a ser colocada em cada amostra, de acordo com seu peso em miligramas, para atingir 20% de umidade. Após a realização do processo de deterioração as sementes foram subdivididas para os testes de germinação e tetrazólio, e os ensaios bioquímicos.

3.2 Teste de germinação

Os testes de germinação foram realizados em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) contendo Ágar (6g L^{-1}). O pH foi ajustado para 5,6 (com NaOH) antes da autoclavagem, e posteriormente, o meio foi dispensado em placas de Petri de 80mm. Antes da semeadura, 10 mg de cada lote de sementes foi desinfetado com uma solução de dicloroisocianurato de sódio (NaDCC; 5g.L^{-1}) contendo 100 μl de Tween 80, por 10 minutos. As sementes foram lavadas duas vezes com água destilada estéril e colocadas no meio. A semeadura foi realizada em uma câmara de fluxo laminar de acordo com Machado Neto e Custódio (2005a). Três placas de Petri foram usadas por espécie, seladas com filme de PVC e transferidas para uma sala de crescimento a $25 \pm 3^\circ\text{C}$ 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 quando elas tiverem a massa embrionária expandida, 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.

Figura 1: Representação em fotos da germinação de sementes de *C. brevicaulis* no período de avaliação

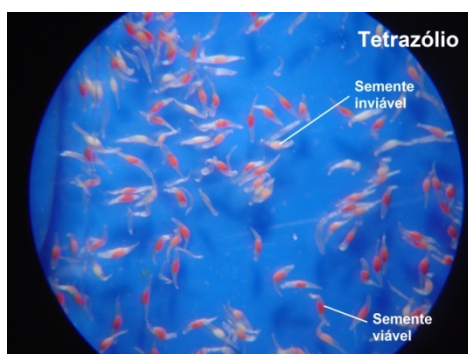


Fonte: arquivo pessoal.

3.3 Teste de tetrazólio

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 coleta. Estes foram colocados em microtubos de 1,5mL contendo solução de sacarose 10% p/v, e deixados por 24h em temperatura ambiente. A solução foi drenada com micropipeta e lavada duas vezes com água destilada. Uma solução de tetrazólio 1% foi adicionada e os microtubos incubados no escuro a 40°C em banho-maria por 24 horas (HOSOMI et al., 2011). Após o período de incubação, a solução de tetrazólio foi descartada e 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 3600dpi. 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-se o software Adobe Photoshop® CS5. Sementes róseo-vermelhas foram consideradas como sementes vivas, enquanto as sementes brancas como mortas. O resultado do tetrazólio foi expresso em porcentagem de sementes viáveis.

Figura 2: Representação em foto do teste de Tetrazólio com pré-condicionamento em sementes de *C. brevicaulis*



Fonte: arquivo pessoal.

3.4 Quantificação de Malondialdeído (MDA)

Cinco miligramas de cada amostra foram macerados em nitrogênio líquido e misturados a 3,25ml de etanol 80% e centrifugados a 12000rpm. Após,

0,75ml do sobrenadante foi misturado com 0,75ml de ácido tiobarbitúrico à 0,65% de ácido tricloroacético 20% (p/v) e incubado por 25 minutos à 95°C. As amostras foram transferidas para banho de gelo e centrifugadas novamente a 12000rpm. A leitura foi realizada em espectrofotômetro nas absorvâncias de 532 e 600nm (HEATH; PACKER, 1968).

Os valores de MDA foram calculados pela fórmula: $MDA = \left\{ \frac{(Abs\ 532) - (Abs\ 600)}{155000} \right\} * 10^6$; onde, A_{532} indica a máxima absorvância do complexo MDA-TBA a 532nm, A_{600} é a absorvância que corrige interferências não específicas e 155000 é o coeficiente molar de extinção do MDA. O ensaio foi conduzido em três repetições e expresso em nanomol de MDA por grama de peso fresco.

3.5 Extração de enzimas e análise

Sementes foram retiradas de cada tratamento e trituradas em nitrogênio líquido a 4°C em tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 7,8) contendo 40 g L⁻¹ de polivinilpirrolidona, 2mM dithiothreitol, 0.1mM EDTA e 1,25mM PEG4000. Os extratos foram centrifugados a 12000 g por 20 min e o sobrenadante dividido em quatro alíquotas. Uma destas foi utilizada para a quantificação de proteínas de acordo com a metodologia de Bradford (1976). As alíquotas restantes foram imediatamente analisadas ou estocadas a -80°C, e utilizadas para medir a atividade das enzimas abaixo:

3.5.1 Superóxido Dismutase (SOD, EC.1.15.11)

A atividade de superóxido dismutase foi medida pelo método de Lei, Song e Fu (2005) com as modificações propostas por Moryia et al. (2015). 50µL de extrato foram adicionados a 2950µL de tampão fosfato 0,1M (pH 7,8) contendo 13mM metionina e 63µM de nitro blue tetrazolium (NBT), com 13µM de riboflavina como alteração. Os tubos foram incubados a 25°C por 15 minutos sob lâmpadas

fluorescentes e absorvância foi medida a 560nm. Tubos contendo o mesmo tampão, mas sem extratos foram incubados no escuro e usados como controle. Uma unidade de SOD (mgproteína)⁻¹ foi definida como a atividade da enzima capaz de inibir em 50% a fotoredução do NBT a formazan azul. Os dados da atividade de SOD foram normalizados pelo conteúdo de proteína.

3.5.2 Peroxidase (PRX, EC. 1.11.1.7)

50µL de extrato foram adicionados a 2,5mL de tampão fosfato 0,1 M (pH 7.8) contendo 13mM de guaiacol e 5mM de peróxido de hidrogênio. A mistura foi incubada por 10 minutos a 30°C e a absorvância lida a 470nm de acordo com Putter (1974). Foi expresso em nanomoles de peróxido de hidrogênio por minuto a A_{470nm} .

3.6 Expressão dos resultados

A germinação e o tetrazólio foram expressos em porcentagem de sementes germinadas e de sementes vivas, respectivamente.

O índice de velocidade de germinação (IVG) para cada lote de sementes testadas foi calculado como uma modificação de Maguire (1962), da seguinte forma: $IVG = \frac{G1}{N1} + \frac{G2}{N2} + \dots + \frac{Gn}{Nn}$ onde G1, G2 e Gn são as sementes germinadas em cada período de contagem. N é o número de dias após a sementeira (7, 14, 21 até germinação constante).

3.7 Análise estatística

A germinação e porcentagem de viabilidade foram transformadas em $\arcsin\sqrt{\left(\frac{x}{100}\right)}$ para normalizar a variação. Os dados foram expressos como valores médios \pm desvios-padrão. O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teste de deterioração controlada em sementes de orquídeas é inédito, desta forma, poucos são os aspectos semelhantes para comparação. A base do trabalho foi realizada a partir das temperaturas e grau de umidade relativa fornecidas na literatura para outras espécies de sementes pequenas como tomate, pimentão, rúcula e brócolis, por exemplo (PANOBIANCO; MARCOS FILHO, 2001, 1998; RAMOS et al., 2004; GOULART; TILLMANN, 2007; MENDONÇA; RAMOS; FESSEL, 2003).

Antes de iniciar a deterioração, foi medida a umidade inicial de cada espécie para que posteriormente atingissem 20% de umidade necessária para a realização do teste de deterioração controlada. Na Tabela 1 estão os dados de umidade inicial e final de cada espécie trabalhada.

Tabela 1: Aferição da umidade final das espécies trabalhadas para realização do teste de deterioração controlada.

Espécie	Umidade inicial da semente (%)	Umidade final da semente (%)
<i>Cattleya brevicaulis</i>	9,8%	20%
<i>Cattleya tigrina</i>	11%	21%
<i>Cattleya tenebrosa</i>	10,5%	17,5%
<i>Cattleya amethystoglossa</i>	10,5%	23%
<i>Encyclia granitica</i>	11%	21%

Segundo Powell e Matthews (2005) é necessário muita precisão nos procedimentos laboratoriais para o ajuste do teor de água nos lotes de sementes, dessa forma, quando expostas à altas temperaturas a deterioração ocorre rapidamente. Além disso, o monitoramento da temperatura utilizada é importante para assegurar o mesmo grau de deterioração para todas as amostras, principalmente quando o teor de água das sementes é elevado.

O teor de água utilizado é muito importante, pois altera o grau de deterioração das sementes, assim como a temperatura. Na literatura são encontrados trabalhos testando diferentes temperaturas e teores de umidade. Estudos realizados por Leeuwen et al. (2005) e Silveira (2006) mostraram que sementes de soja e

amendoim, respectivamente, com 15% de teor de água apresentaram maior porcentagem de germinação do que as sementes com 20 e 25%.

Em todas as temperaturas avaliadas para o teste de tetrazólio, as sementes de *C. brevicaulis* apresentaram diminuição na viabilidade conforme o aumento de exposição à alta temperatura. Além disso, observou-se que em 43 e 45°C a viabilidade das sementes foi menor, ou seja, houve uma maior deterioração (Figura 3).

Em *C. tigrina*, as sementes começam a perder mais viabilidade com 15 horas de deterioração em 43 e 45°C. Observou-se ainda que em 43 e 45°C, no tratamento de 48 horas de exposição, as sementes estavam completamente deterioradas (Figura 3).

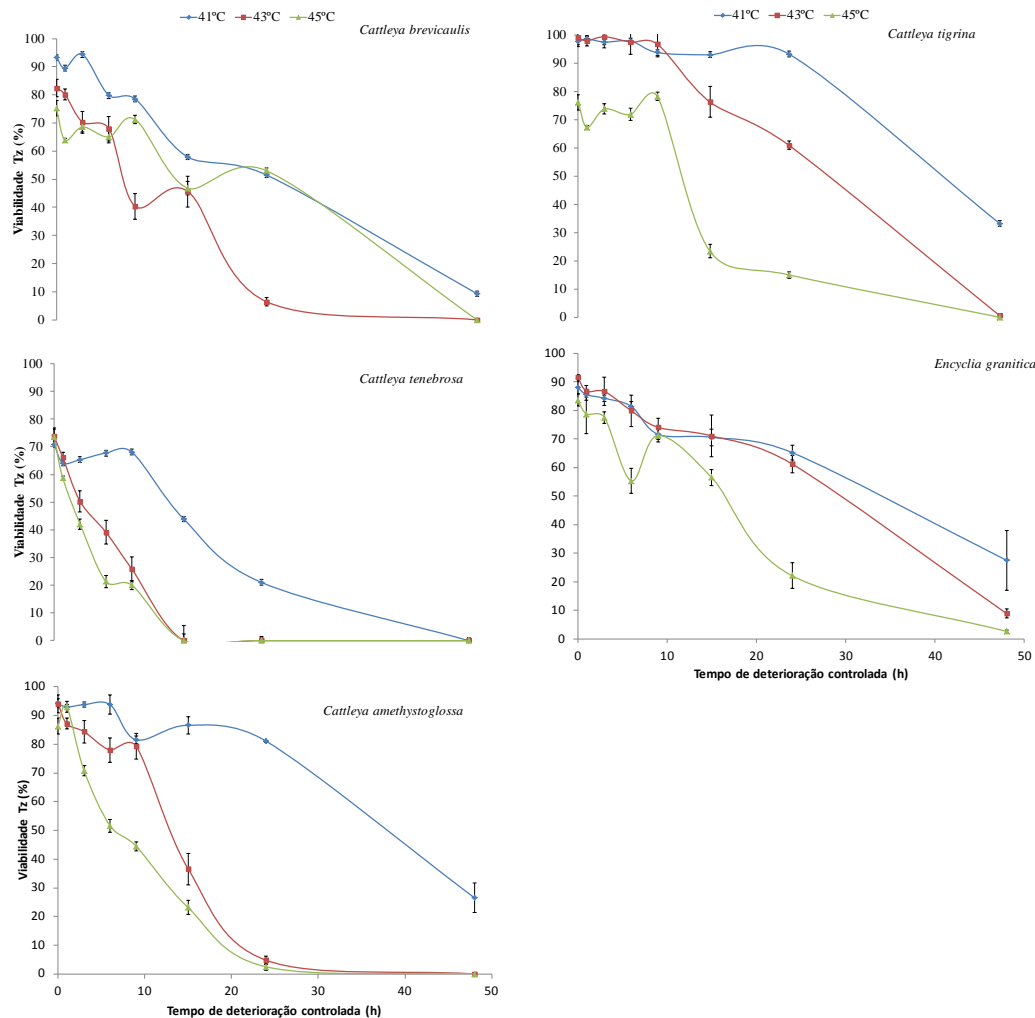
As sementes de *C. tenebrosa* apresentaram desempenho inferior pelo teste de tetrazólio. Após 15 horas de deterioração, a viabilidade diminuiu, destacando-se que, nas temperaturas de 43 e 45°C, as sementes apresentaram uma maior sensibilidade em períodos curtos de exposição (Figura 3).

E. granitica apresentou viabilidade semelhante nos primeiros tempos de deterioração para as três temperaturas, porém com 15 horas de deterioração a viabilidade das sementes começou a diminuir, principalmente nas sementes deterioradas à 45°C (Figura 3).

Para *C. amethystoglossa*, o teste de tetrazólio destacou alta viabilidade das sementes em 41°C de deterioração em quase todos os tratamentos, já em 43 e 45°C, observou-se um decréscimo na viabilidade com 15 horas de deterioração, mostrando sementes mais sensíveis (Figura 3).

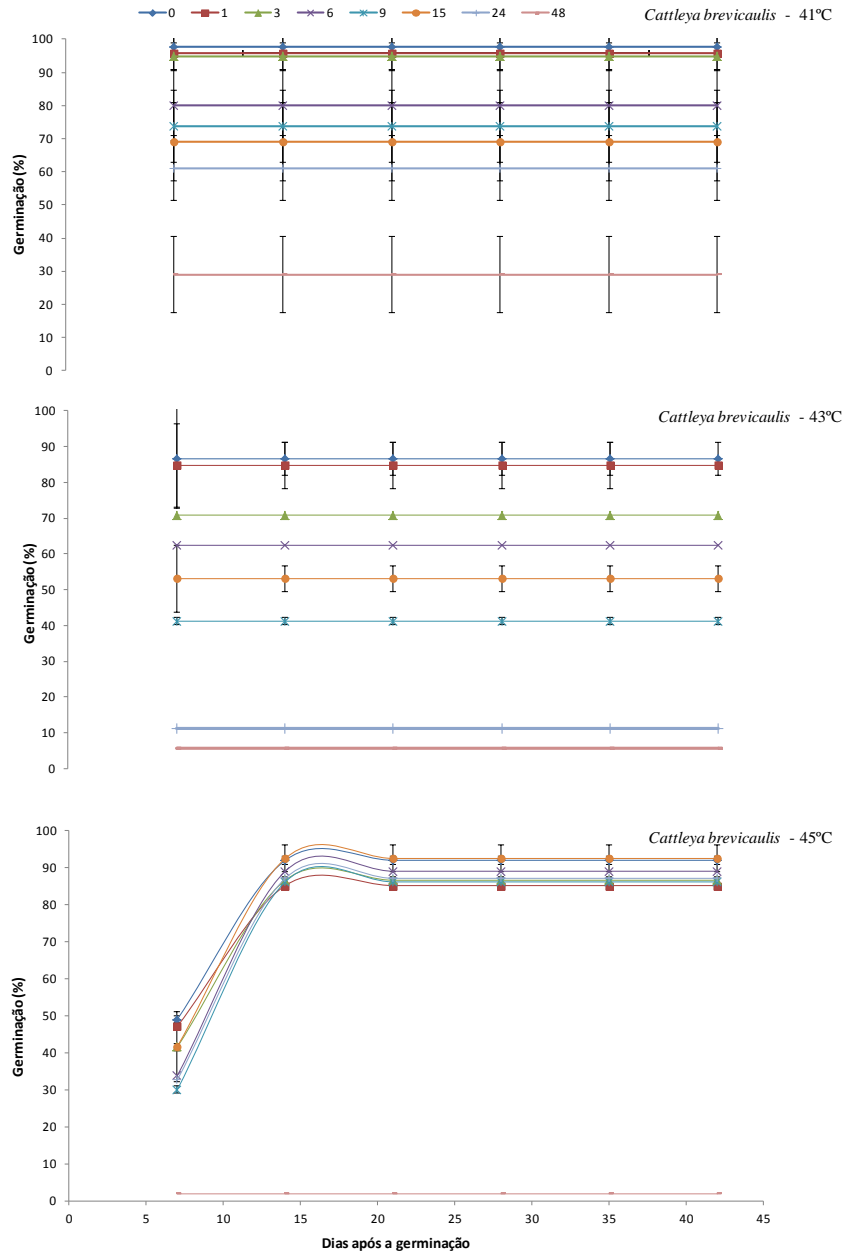
De forma geral, a temperatura mais efetiva para diminuir a viabilidade pelo teste de tetrazólio foi a 45°C, e as espécies que foram mais sensíveis à deterioração foram *C. tenebrosa* e *C. amethystoglossa*.

Figura 3: Porcentagens de viabilidade por tetrazólio de cinco espécies de orquídeas submetidas a três temperaturas (41, 43 e 45°C) no ensaio de deterioração controlada.



A germinação de sementes expostas à 45°C foi a mais homogênea entre as três temperaturas utilizadas em *C. brevicaulis*, pois em todos os tratamentos, à exceção do de 48 horas, observaram-se altas porcentagens de germinação, havendo um aumento na segunda semana de avaliação, ocasionado por um estímulo causado pelo estresse da deterioração. Em 43°C, as sementes de *C. brevicaulis* apresentaram germinação decrescente conforme o aumento de exposição à temperatura, porém, quando comparada com a germinação de 41°C, observa-se que a porcentagem de germinação é mais baixa, caracterizando assim o processo de deterioração das sementes. Em 41°C a germinação das sementes de *C. brevicaulis* também se manteve decrescente e constante (Figura 4).

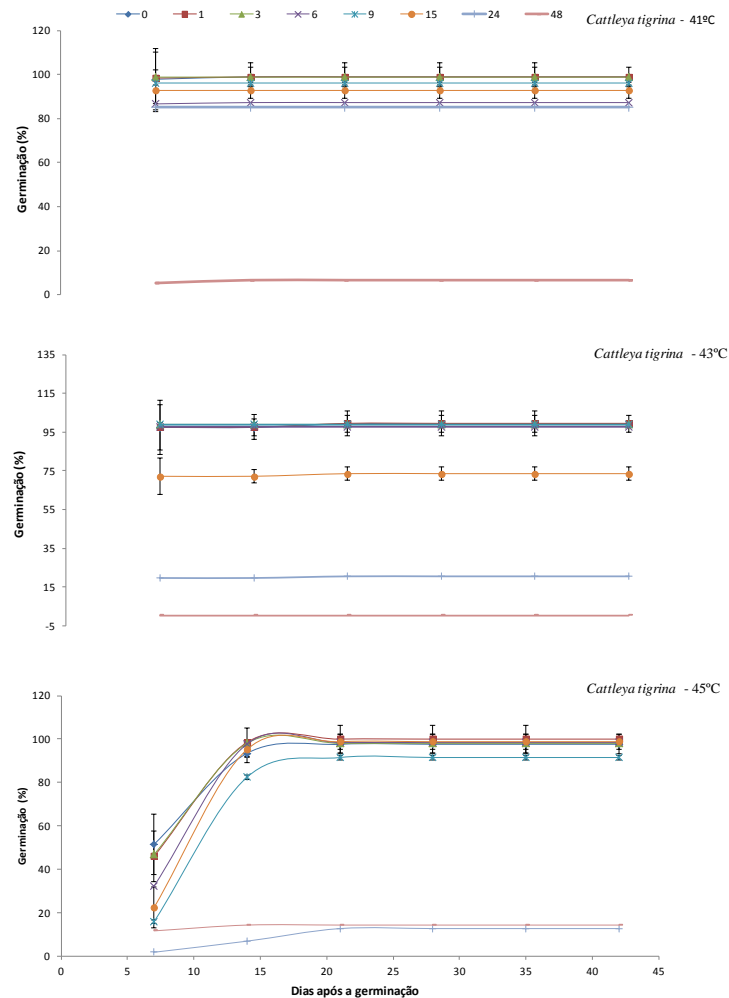
Figura 4: Porcentagem de germinação de sementes de *C. brevicaulis* submetidas a três temperaturas (41, 43 e 45°C) no ensaio de deterioração controlada.



C. tigrina apresentou um comportamento germinativo semelhante à *C. brevicaulis* em 45°C, onde em quase todos os períodos de exposição, à exceção de 24 e 48h apresentaram um aumento de germinação na segunda semana. À 43°C as sementes exibiram uma germinação mais uniforme desde a primeira contagem, porém os períodos de 15, 24 e 48h foram distintos, sendo que 48h foi o que

apresentou a maior redução da germinação. À 41°C, apenas 48h foi suficiente para diminuir a germinação de sementes de *C. tigrina* (Figura 5).

Figura 5: Porcentagem de germinação de sementes de *C. tigrina* submetidas a três temperaturas (41, 43 e 45°C) no ensaio de deterioração controlada.

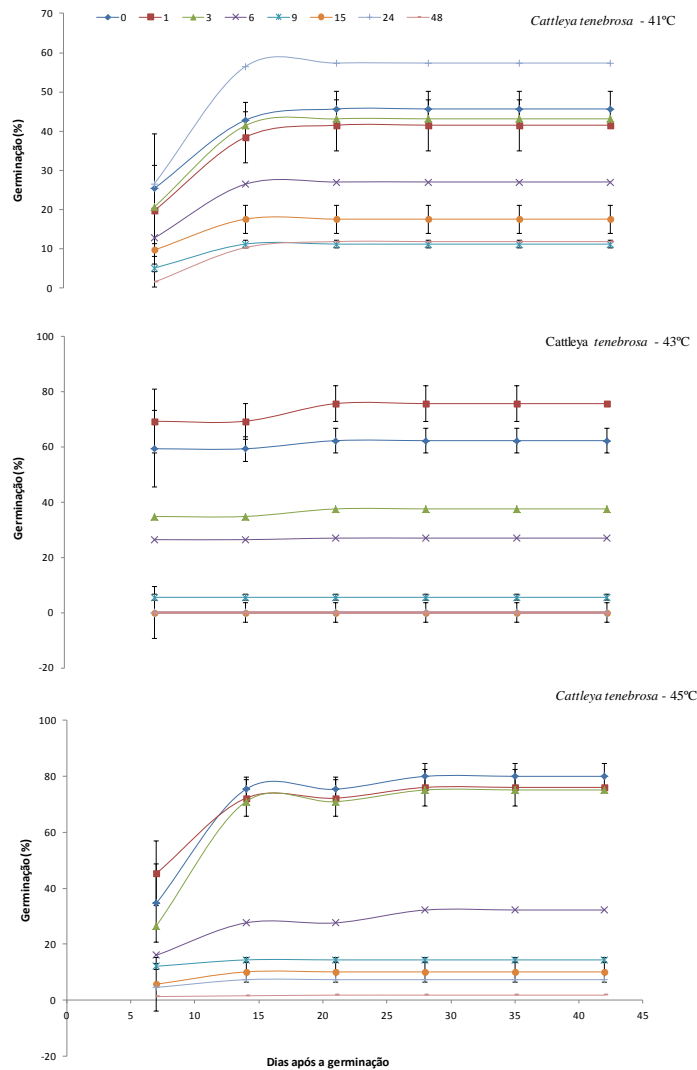


As outras três espécies (*C. tenebrosa*, *C. amethystoglossa* e *E. granitica*) apresentaram um comportamento distinto das duas anteriores.

Em *C. tenebrosa* as sementes submetidas a 41°C exibiram uma germinação, para todos os tempos testados, abaixo de 60%, sendo que o material não exposto ao estresse térmico foi o que apresentou a maior germinação. Todavia, a exposição ao menor tempo de deterioração controlada foi suficiente para elevar a germinação para acima de 70%, tanto a 43, como a 45°C, sendo que nesta última

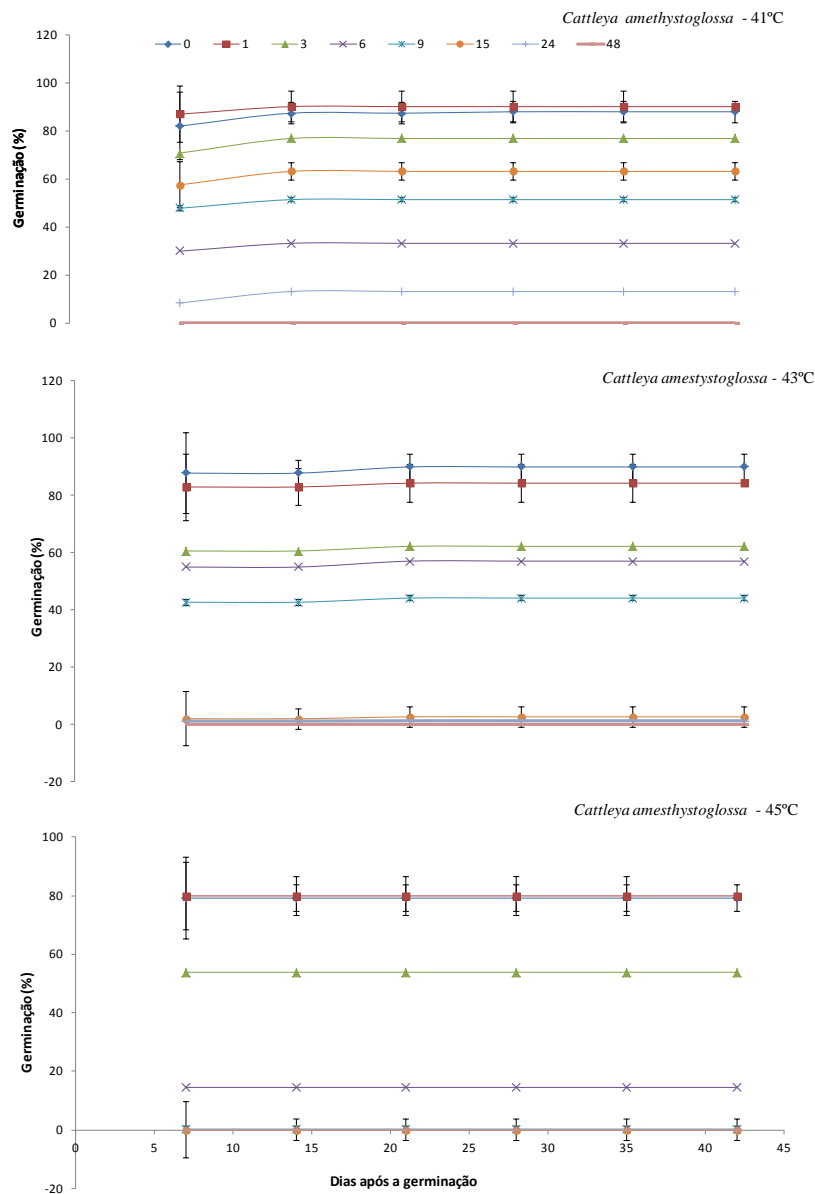
temperatura as sementes expostas a três horas também apresentaram um desempenho igual às sementes não expostas ou expostas por apenas uma hora.

Figura 6: Porcentagem de germinação de sementes de *C. tenebrosa* submetidas a três temperaturas (41, 43 e 45°C) no ensaio de deterioração controlada.



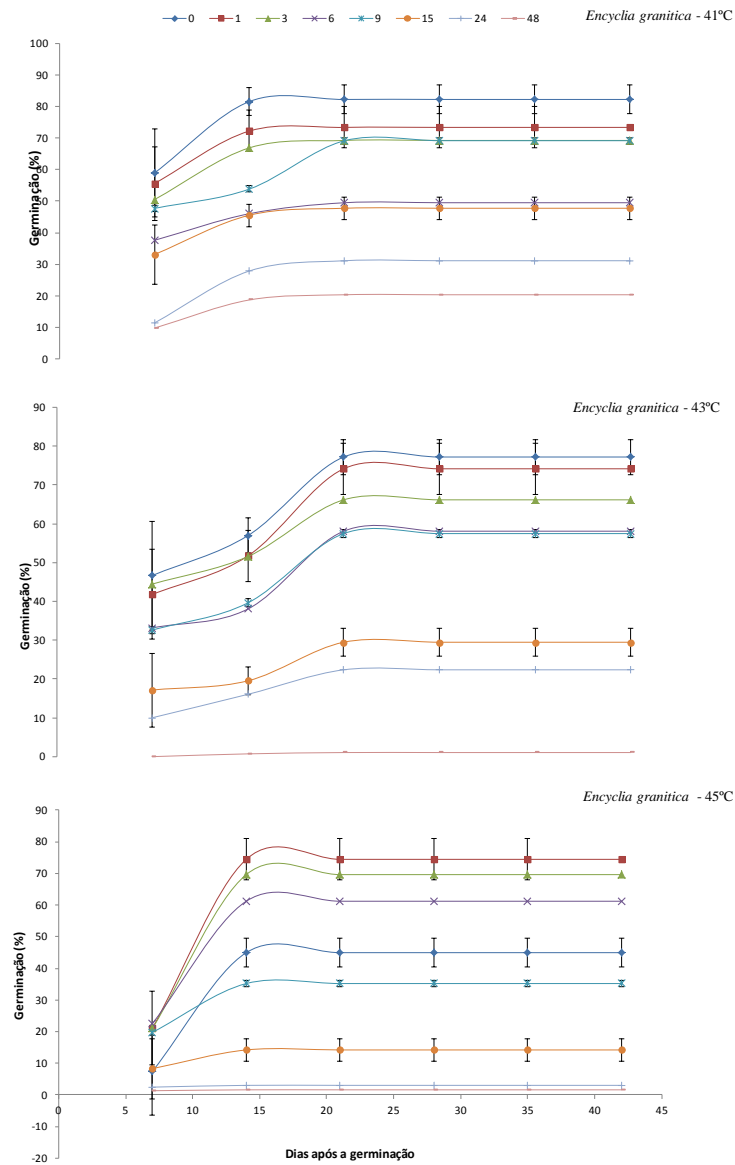
Em *C. amethystoglossa* não houve diferenças entre as sementes não submetidas ou submetidas à uma hora em qualquer uma das temperaturas (Figura 7). A partir de 3h de exposição a qualquer das temperaturas utilizadas houve uma queda na germinação, sendo que para todas 48h foi suficiente para zerar a germinação. Em 41°C, o declínio da germinação é facilmente observado ao longo do processo de deterioração (Figura 7).

Figura 7: Porcentagem de germinação de sementes de *C. amethystoglossa* submetidas a três temperaturas (41, 43 e 45°C) no ensaio de deterioração controlada.



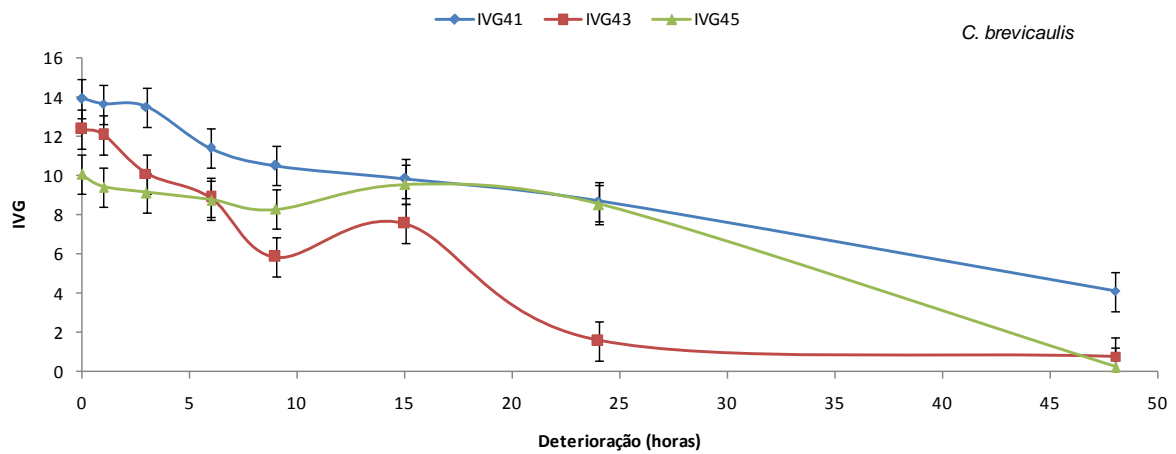
Para *E. granitica* a germinação à 41°C foi afetada após uma hora de exposição. Quando expostas a 43 e 45°C o efeito da deterioração controlada foi mais efetivo após três horas de tratamento e após 48h não havia mais sementes vivas. Apesar de 41°C já ter produzido sementes com germinações diferenciadas, as temperaturas mais elevadas produziram amostras mais distintas (Figura 8).

Figura 8: Porcentagem de germinação de sementes de *E. granitica* submetidas a três temperaturas (41, 43 e 45°C) no ensaio de deterioração controlada.



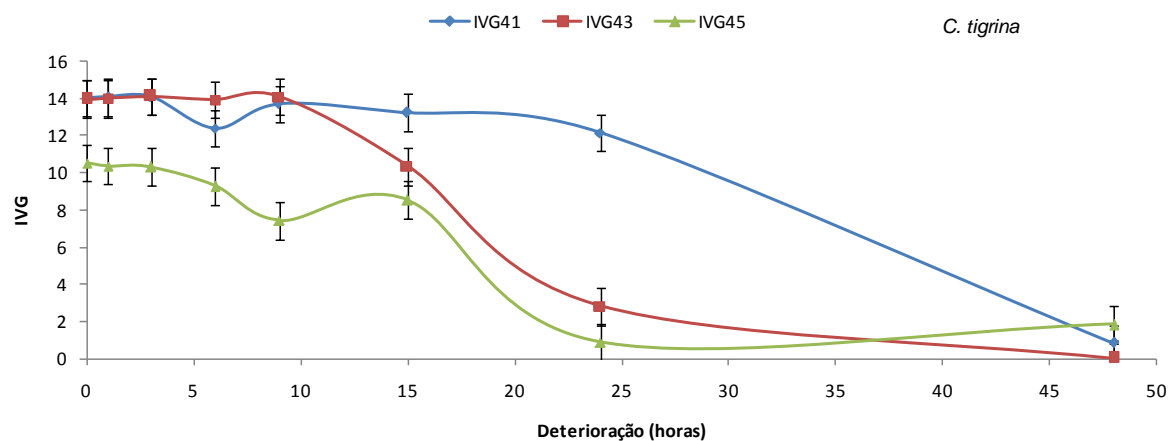
O IVG dos diferentes tratamentos de *C. brevicaulis*, foi distinto para as três temperaturas. Em 41°C houve uma queda mais atenuada que se torna mais evidente a partir de 6h. Para 43°C essa queda se manifesta com três horas e 45°C mantém-se constante decaindo abruptamente entre 24 e 48h (Figura 9).

Figura 9: Índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de *C. brevicaulis* submetidas a três temperaturas (41, 43 e 45°C) no ensaio de deterioração controlada.



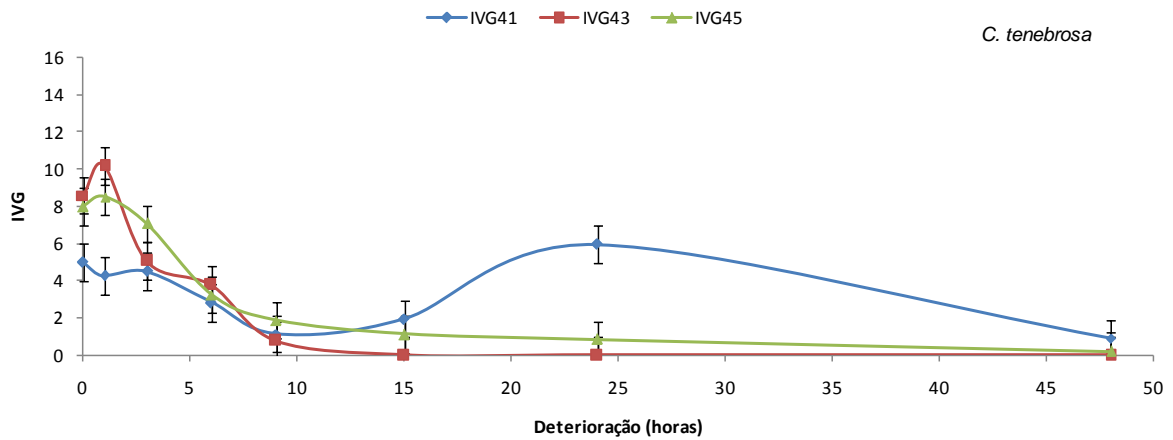
Em *C. tigrina*, o IVG mostrou-se igual para 41 e 43°C até 9h. A partir daí, há uma queda mais acentuada para o material exposto a 43°C. O IVG das sementes expostas a 45°C foi inferior ao das outras duas temperaturas, igualando-se após 24 com 43°C e em 48h com 41°C (Figura 10).

Figura 10: Índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de *C. tigrina* submetidas a três temperaturas (41, 43 e 45°C) no ensaio de deterioração controlada.



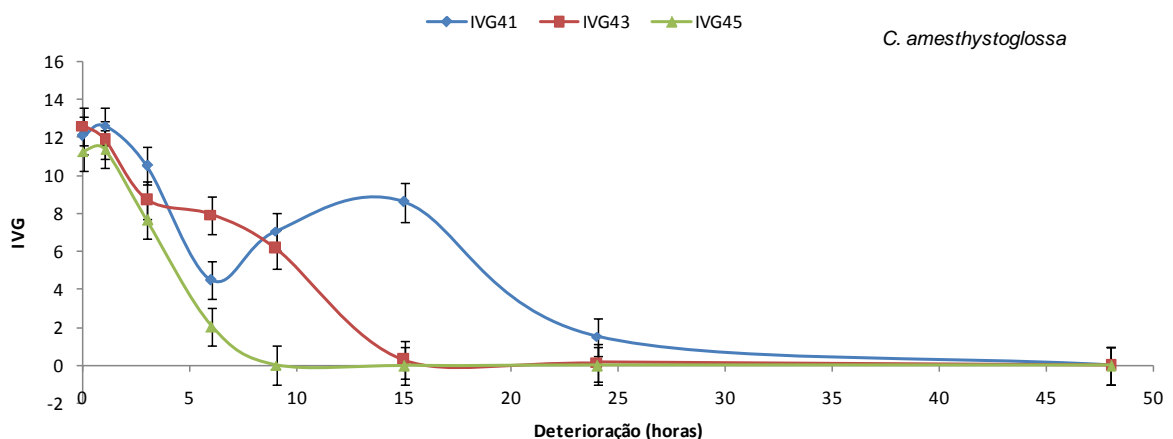
Para *C. tenebrosa*, o IVG para as temperaturas de 41 e 43°C apresentou-se igual até uma hora de exposição. A partir de três horas o IVG para as todos os tratamentos foi igual, com exceção de 24h a 41°C (Figura 11).

Figura 11: Índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de *C. tenebrosa* submetidas a três temperaturas (41, 43 e 45°C) no ensaio de deterioração controlada.



Para *C. amethystoglossa*, o IVG decresceu em qualquer tempo em todas as temperaturas não havendo diferenças entre os tratamentos até três horas. Com 6h de exposição às temperaturas, há uma distinção entre os IVG sendo que o IVG de 43°C apresenta-se superior aos demais, porém com ele se iguala ao de 41°C que permanece superior até o período de 15 horas. Deste ponto para frente não há mais diferença entre as temperaturas (Figura 12).

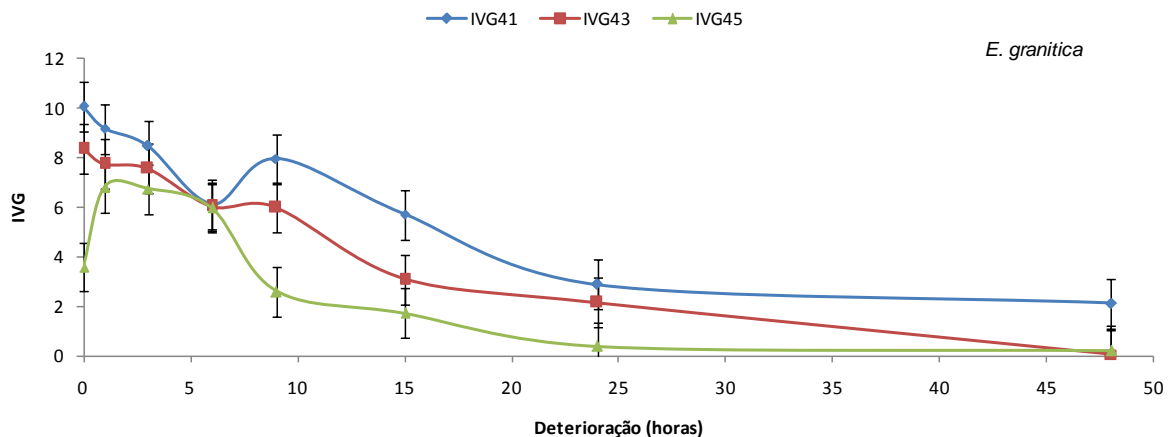
Figura 12: Índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de *C. amethystoglossa* submetidas a três temperaturas (41, 43 e 45°C) no ensaio de deterioração controlada.



O IVG das sementes de *E. granitica* nas três temperaturas foi decrescente e não diferiu até 9h. Neste ponto as sementes expostas a 45°C apresentaram uma maior queda. Em 15h somente 41°C apresentava o IVG mais

elevado que as demais. Em 24 e 48 o IVG das sementes expostas, iniciou o declínio a partir de 9 horas de tratamento, porém, apenas os IVGs de 43 e 45°C atingiram zero no último tratamento (48 horas), enquanto 41°C se manteve próximo a 3 (Figura 13).

Figura13: Índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de *E. granitica* submetidas a três temperaturas (41, 43 e 45°C) no ensaio de deterioração controlada.

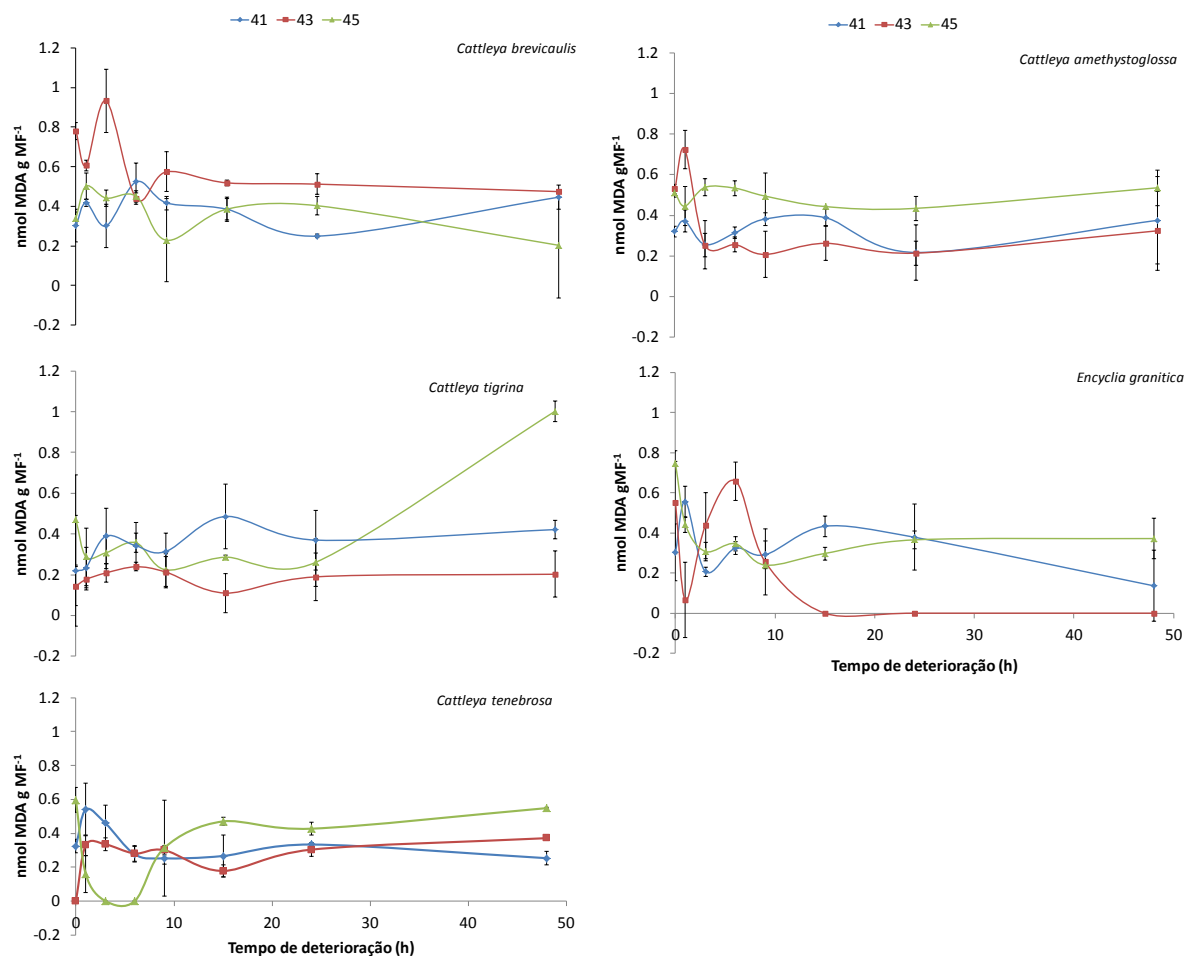


A produção de malondialdeído (MDA) acontece por peroxidação lipídica. Assim, processos que alterem a regulação do sistema de produção de peróxidos pode aumentar a produção deste metabólito que é um indicador da deterioração celular. Na Figura 14 podemos observar que o incremento na produção de MDA aconteceu em quatro espécies (*C. amethystoglossa*, *C. tigrina*, *C. tenebrosa* e *E. granitica*), sendo que em duas espécies costeiras (*C. tigrina* e *C. tenebrosa*) apresentaram uma maior produção com quarenta e oito horas de deterioração controlada. *C. brevicaulis* apresentou uma queda na produção de MDA.

O estresse causado nas sementes pelo processo de deterioração controlada desestabiliza toda a estrutura das membranas celulares, favorecendo a peroxidação lipídica e a consequente formação de subprodutos indicadores de estresse oxidativo como o malondialdeído (MDA), a ação de radicais livres estimulando na atividade das enzimas superóxido dismutase e peroxidase, além de promover a perda gradativa de viabilidade das sementes (KRANNER et al., 2010; EL-MAAROUF-BOUTEAU et al., 2011; MORYIA et al., 2015). Todavia, nas sementes estudadas, a peroxidação lipídica originando MDA não foi suficiente para produzir valores superiores nas sementes submetidas à deterioração controlada do que nas sementes não armazenadas. Houve diferenças entre as temperaturas.

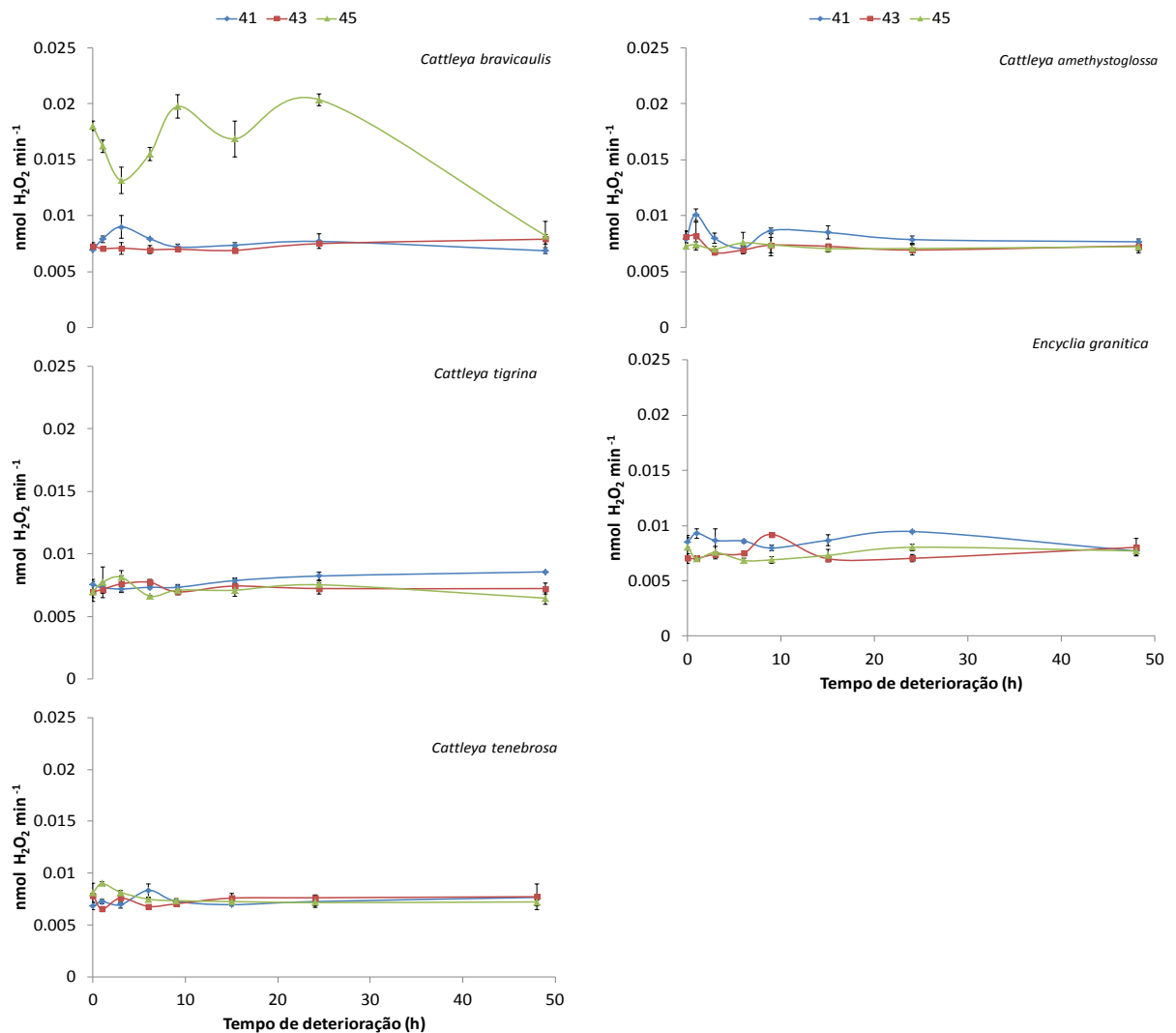
O aumento contínuo do tempo de exposição das sementes às altas temperaturas de deterioração controlada fez com que os teores de MDA e a atividade de SOD e PRX caíssem gradativamente, caracterizando os danos sofridos e podendo levar à morte. Porém, isso não ocorre em todas as espécies. Em *C. tigrina* e *C. tenebrosa*, por exemplo, foi observado um aumento no teor de MDA com 48 horas de tratamento. De acordo com Ataíde, Flores e Borges (2012), o conteúdo de malondialdeído (MDA) presente em sementes de *P. nitens* foi reduzido significativamente após 72 horas de envelhecimento artificial podendo ter sido causado pela morte da semente ou pela ação de enzimas detoxificantes. O mesmo ocorreu com sementes de milho que tiveram a atividade de peroxidase reduzidas com o aumento do tempo de envelhecimento (SPINOLA; CÍCERO; MELO, 2000).

Figura 14: Quantificação de MDA em sementes de cinco espécies de orquídeas submetidas a três temperaturas (41, 43 e 45°C) no ensaio de deterioração controlada.



À exceção de *C. brivicaulis* que apresentou alta atividade de peroxidase a 45°C (Figura 16), houve pouca variação na atividade desta enzima para as outras espécies. De maneira geral a atividade de PRX foi mais elevada a 41°C, mas não diferiram após 48h de exposição às três temperaturas. Segundo Demirkaya, Dietz e Sivritepe (2010) e Demirkaya (2013) a atividade enzimática diminui após o envelhecimento em sementes pequenas. Fato este não corroborado pelos dados aqui encontrados. Para Kranner et al. (2010) a atividade enzimática pode sofrer alterações durante a vida das sementes, apresentando menores atividades antes da germinação e após o envelhecimento, mas altas atividades durante a fase viável da semente apresentando uma forma de sino, o que coincide com o fenômeno descrito por Bailly, El-Maarouf-Bouteau e Corbineau (2008) de janela oxidativa para a germinação.

Figura 16: Atividade de PRX em sementes de cinco espécies de orquídeas submetidas a três temperaturas (41, 43 e 45°C) no ensaio de deterioração controlada.



As espécies estudadas apresentaram, de maneira geral, desempenhos semelhantes, ou seja, de acordo com o aumento da temperatura e da exposição ao tempo deterioração, a viabilidade e a porcentagem de germinação das sementes diminuíram mostrando-se sensíveis ao processo.

Com 48 horas, nenhuma das espécies submetidas à deterioração controlada em 41°C apresentou porcentagem de germinação maior do que 30%. A 43°C, todas as espécies registraram porcentagens próximas a 0%, sendo o mesmo registrado para 45°C, com exceção da *C. tigrina* que ficou próxima aos 20% de germinação. De acordo com os estudos em soja de Leeuwen et al. (2005), o aumento da temperatura também influenciou no desempenho das sementes estudadas, observando maior germinação em sementes deterioradas à 41°C.

Os testes bioquímicos também não conseguiram detectar a deterioração das sementes através do aumento da produção de malondialdeído, indicador de estresse e resultante da peroxidação lipídica ou pelas atividades das enzimas superóxido dismutase e peroxidase.

Entre todas as espécies estudadas foi observado que a deterioração de 45°C serviu como um estímulo, para algumas, nas primeiras horas de tratamento elevando a germinação que se estabilizou ao longo da avaliação, fazendo com que as sementes apresentassem percentuais de germinação superiores quando comparadas com as temperaturas de 43 e 41°C. Isso pode ter ocorrido através da “janela oxidativa da germinação” como proposto por El-Maarouf Bouteau e Bailly (2008) ou no qual um pequeno estresse que produza ROS pode aliviar a dormência, como esse estímulo que foi causado apenas nas primeiras horas de deterioração. Porém, o prolongamento do estresse acarretou danos de tal grandeza que levou em vários casos à morte da semente, como posto por Kranner et al. (2010) aonde um pequeno estresse pode ser estimulador, mas o excesso acaba sendo letal para as células.

De acordo com Ramos et al. (2004), sementes pequenas absorvem água mais rapidamente e de maneira desuniforme, apresentando comportamento variável entre as sementes avaliadas da amostra. Sendo assim, todos os outros procedimentos foram adequados às condições de trabalho. Conforme dito por Delouche (2002), lotes de sementes da mesma espécie apresentam velocidades de deterioração diferentes, o que pode ocorrer também em sementes individuais de um mesmo lote conforme as diferentes condições e traumas a que elas foram expostas.

Quanto mais alto o grau de umidade da semente, maior os danos causados pela deterioração. Este processo agrava-se quando a temperatura é elevada. Assim, das três temperaturas utilizadas no presente trabalho, 43 e 45°C se mostraram mais eficientes para a realização de um processo de deterioração controlada.

5 CONCLUSÕES

O teste de deterioração controlada foi eficaz para modificar a resposta das diferentes espécies à germinação. As temperaturas mais elevadas de 43 e 45°C e os tempos de exposição de 15 horas ou mais foram mais drásticos para as espécies estudadas, gerando sub-amostras com diferentes potenciais fisiológicos;

A quantificação de MDA e as atividades enzimáticas não foram eficientes para medir o grau de deterioração das sementes e consequente perda de viabilidade;

Tanto MDA como as atividades enzimáticas não foram eficazes como marcadores de envelhecimento;

Os testes de germinação, tetrazólio e o IVG foram eficientes para mensurar os danos ocasionados às sementes de orquídeas submetidas ao teste de deterioração controlada para todas as espécies estudadas.

REFERÊNCIAS

ALVAREZ-PARDO, V.; FERREIRA, A.G. Armazenamento de sementes de orquídeas. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 28, n. 2, p. 92-98, 2006.

ARDITTI, J; GHANI, A.K.A. Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. **New Phytologist**, v. 146, n. 3, p. 569-569, 2000.

ATAÍDE, G.M.; FLORES, A.V.; BORGES, E.E.L. Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de *Pterogynenitens* Tull. durante o envelhecimento artificial. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 42, n.1, p. 71-76, 2012.

ÁVILA-DIAZ, I. et al. In vitro propagation of theen dangered orchid *Laelia speciosa*. **Plant Cell Tissue Organ Tissue Culture**, v. 99, n. 3, p. 335-343, 2009.

BAILLY, C.; EL-MAAROUF-BOUTEAU, H.; CORBINEAU, F. From intracellular signaling networks to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology. **Comptes Rendus Biologies**, v. 331, n. 10, p. 806-814, 2008.

BARROS, F. et al. Orchidaceae. In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB20039>>. Acesso em: 13 ago. 2015

BENHAMOU, N.; NICOLE, M. Cell biology of plant immunization against microbial infection: the potential of induced resistance in controlling plant diseases. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 37, n. 10, p. 703-719, 1999.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1, p. 248-254, 1976.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Regras para análises de sementes**. Brasília: SNAD/DNDV/CLAV, 2009.

CATANEO, A.C. et al. Atividade de superóxido dismutase em plantas de soja (*Glycinemax* L.) cultivadas sob estresse oxidativo causado por herbicida. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 4, p. 23-31, 2005.

CHASE, M.W. et al. An updated classification of Orchidaceae. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 177, n. 2, p. 151-174, 2015.

COLVILLE, L. et al. Volatile fingerprints of seeds of four species indicate the involvement of alcoholic fermentation, lipid peroxidation, and Maillard reactions in seed deterioration during ageing and desiccation stress. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, n. 18, p. 6519-6530, 2012.

CUSTÓDIO, C.C. Testes rápidos para avaliação do vigor de sementes: uma revisão. **Colloquium Agrariae**, v.1, n.1, p. 29-41, 2005.

- DELL'AQUILA, A. Towards new computer imaging techniques applied to seed quality testing and sorting. **Seed Science and Technology**, v. 35, n. 3, p. 519-538, 2007.
- DELOUCHE, J.C. Germinação, deterioração e vigor da semente. **Seed News**, v. 6, n. 6, p. 24-31, 2002.
- DEMIRKAYA, M. Relationships between antioxidant enzymes and physiological variations occur during ageing of pepper seeds. **Horticulture, Environment, and Biotechnology**, v. 54, n. 2, p. 97-102, 2013.
- DEMIRKAYA, M.; DIETZ, K.J.; SIVRITEPE, H.O. Changes in antioxidant enzymes during ageing of onion seeds. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, v. 38, n. 1, p. 49-52, 2010.
- DUTRA, A.S; MEDEIROS FILHO. S. Teste de deterioração controlada na determinação do vigor em sementes de algodão. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 30, n. 1, p. 19-23, 2008.
- DUTRA, D.; KANE, M.E; RICHARDSON, L. Asymbiotic seed germination and in vitro seedling development of *Cyrtopodium punctatum*: a propagation protocol for an endangered Florida native orchid. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 96, n. 3, p. 235-243, 2009.
- ELLIS, R.H; HONG, T.D. Seed longevity - moisture content relationships in hermetic and open storage. **Seed Science and Technology**, v. 35, n. 2, p. 423-431, 2007.
- EL-MAAROUF-BOUTEAU, H. et al. Role of protein and mRNA oxidation in seed dormancy and germination. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, 2013.
- EL-MAAROUF-BOUTEAU, H.; BAILLY, C. Oxidative signalling in seed germination and dormancy. **Plant Signalling and Behavior**, v. 3, n. 3, p. 175-182, 2008.
- EL-MAAROUF-BOUTEAU, H. et al. DNA alteration and programmed cell death during ageing of sunflower seed. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 14, p. 5003-5011, 2011.
- FOYER, C.H.; NOCTOR, G. Redox homeostasis and antioxidant signalling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. **The PlantCell**, v. 17, n. 7, p. 1866-1875, 2005.
- GOULART, L.S.; TILLMANN, M.A.A. Vigor de sementes de rúcula (*Eruca sativa* L.) pelo teste de deterioração controlada. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 29, n. 2, p. 179-186, 2007.
- HEATH, R.L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives in Biochemistry and Biophysics**, v. 125, n. 1, p. 189-198, 1968.
- 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. et al. 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.

IUCN. **Orchids**: Status survey and conservation action Plan. Los Gatos: Graphic express, 1996.

JUDD, W.S. et al. **Sistemática vegetal**: um enfoque filogenético. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

JUNG, S. et al. Antioxidant responses of cucumber to photoinhibition and oxidative stress induced by norflurazon under high and low PPFs. **Plant Science**, v. 153, n. 2, p. 145-154, 2000.

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

KRANNER, I. et al. Inter-nucleosomal DNA fragmentation and loss of RNA integrity during seed ageing. **Plant Growth Regulation**, v. 63, n. 1, p. 63-72, 2011.

KRANNER, I. et al. What is stress? Concepts, definitions and applications in seed science. **New Phytologist**, v. 188, n. 3, p. 655-673, 2010.

KRUSE, N.D. et al. Estresse oxidativo em girassol (*Helianthus annuus*) indica sinergismo para a mistura dos herbicidas metribuzin e clomazone. **Planta Daninha**, v. 24, n. 2, p. 379-390, 2006.

LEEUWEN, K.V. et al. Deterioração controlada em sementes de soja armazenadas. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 33, n. 1, p. 75-82, 2005.

LEI, Y.B.; SONG, S.Q.; FU, J.R. Possible involvement of antioxidant enzymes in the cross tolerance of the germination/growth of wheat seed to salinity and heat stress. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 47, n. 10, p. 1211-1219, 2005.

LEYMARIE, J. et al. Role of reactive oxygen species in the regulation of *Arabidopsis* seed dormancy. **Plant and Cell Physiology**, v. 53, n. 1, p. 96-106, 2012.

LIMA, S.E; ABDALLA, P.S.D. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 37, n. 3, p. 293-303, 2001.

LONG, B. et al. In vitro propagation of four threatened *Paphiopedilum* species (Orchidaceae). **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 101, n. 2, p. 151-162, 2010.

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

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

MACIEL, H.P.F.; GOUVÊIA, C.M.C.P.; PASTORE, G.M. Extração e caracterização parcial de peroxidase de folhas de *Copaifera langsdorffii* Desf. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 2, p. 221-225, 2007.

MAGUIRE, J.D. Speed of germination aid in selection and evaluation of seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v. 2, n. 2, p. 176-177, 1962.

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

MATTHEWS, S. et al. Evaluation of seed quality: from physiology to international standardization. **Seed Science Research**, v. 22, n. S1, p. 69–73, 2012.

MCCUE, P. et al. A model for enhanced pea seedling vigour following low pH and salicylic acid treatments. **Process Biochemistry**, v. 35, n. 6, p. 603-613, 2000.

MCDONALD, M.B. Orthodox seed deterioration and its repair. In: BENECH-ARNOLD, R.I.; SANCHEZ, R.A. (eds.) **Handbook of seed physiology**: applications to agriculture. New York: Food Products Press, 2004. p. 273-298,

MCDONALD, M.B; EVANS, A.F.; BENNETT, M.A. Using Scanners to improve seed and seedling evaluations. **Seed Science and Technology**, v. 29, n. 3, p. 683-689, 2001.

MENDONÇA, E.A.F.; RAMOS, N.P.; FESSEL, S.A. Adequação da metodologia do teste de deterioração controlada para sementes de brócolis (*Brassicaoleracea* L. – var. *italica*). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 25, n. 1, p. 18-24, 2003.

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.

MORYIA, L.M. et al. Seed vigour better to be assessed by physiological markers rather than expression of antioxidant enzymes in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Australian Journal of Crop Science**, v. 9, n. 1, p. 30-40, 2015.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio-arsays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NAGEL, M.; BÖRNER, A. The longevity of crop seeds stored under ambient conditions. **Seed Science Research**, v. 20, n. 1, p. 1-12, 2010.

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.

NIKISHINA, T.V et al. Cryopreservation of seeds of some tropical orchids. **Doklady Biochemistry and Biophysics**, v. 378, n. 1, p. 231–233, 2001.

ORACZ, K. et al. ROS production and protein oxidation as novel mechanism for seed dormancy alleviation. **The Plant Journal**, v. 50, n. 3, p. 452-465, 2007.

- PANOBIANCO, M.; MARCOS FILHO, J. Comparação entre métodos para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de pimentão. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 20, n. 2, p. 68-72, 1998.
- PANOBIANCO, M.; MARCOS FILHO, J. Envelhecimento acelerado e deterioração controlada em sementes de tomate. **Scientia Agricola**, v. 58, n. 3, p. 525-531, 2001.
- PESKE, S.T.; ROSENTHAL, M.D.; MEDEIROS ROTA, G.R. **Sementes: fundamentos científicos e tecnológicos**. 1. ed. Pelotas: Rua Pelotas, 2003.
- POWELL, A.A. Seed improvement by selection and invigoration. **Scientia Agricola**, v. 55, n. spe, p. 126-133, 1998.
- POWELL, A.A.; MATTHEWS, S. Evaluation of controlled deterioration, a new vigour test for small seeds vegetables. **Seed Science and Technology**, v. 9, n. 2, p. 633-640, 1981.
- POWELL, A.A.; MATTHEWS, S. Towards the validation of the controlled deterioration vigour test for small seeded vegetables. **Seed Testing International**, v. 9, n. 129 (ed. 2), p. 21-24, 2005.
- PRITCHARD, H.W.; POYNTER, A.L.C.; SEATON, P.T. Interspecific variation in orchid seed longevity in relation to ultra-dry storage and cryopreservation. **Lindleyana**, v. 14, p. 92-101, 1999.
- PRITCHARD, H.W.; SEATON, P.T. Orchid seed storage: Historical perspective, current status, and future prospects for long-term conservation. **Selbyana**, v. 14, p. 89-104, 1993.
- PUTTER, J. Peroxidase. In: Bergermeyer, H.U. (ed.). **Methods in enzymatic analysis**. New York: Academic Press, 1974. p. 567-1124.
- RAMOS, N.P. et al. Envelhecimento acelerado em sementes de rúcula (*Eruca sativa* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 26, n. 1, p. 98-103, 2004.
- SCANDALIOS, G.J. Oxygen stress and superoxide dismutases. **Plant Physiology**, v. 101, n. 1, p. 7-12, 1993.
- 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.
- SEATON, P.T.; PRITCHARD, H.W. Life in the freezer. **Orchids**, v. 77, n. 10, p. 762-773, 2008.
- SHOUSHTARI, B.D. et al. Germination and viability staining of orchid seeds following prolonged storage. **Lindleyana**, v. 9, p. 77-84, 1994.

SIEGEL, B.Z. Plant peroxidases: an organismic perspective. **Plant Growth Regulators**, v. 12, n. 3, p. 303-312, 1993.

SILVEIRA, C.M. **Teste de deterioração controlada em sementes de amendoim**. 2006. 69f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática** - guia ilustrado para identificação das Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II. 2. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008.

SPINOLA, M.C.M.; CÍCERO, S.M.; MELO, M. Alterações bioquímicas e fisiológicas em sementes de milho causadas pelo envelhecimento acelerado. **Scientia Agricola**, v. 57, n. 2, p. 263-270, 2000.

TORRES, S.B. Teste de deterioração controlada em sementes de maxixe. **Horticultura Brasileira**. Brasília, v. 23, n. 2, p. 301-310, 2005.