

SEMENTES DE ORQUÍDEAS: CONSERVAÇÃO E AVALIAÇÃO DE VIABILIDADE

SILVÉRIO TAKAO HOSOMI

SEMENTES DE ORQUÍDEAS: CONSERVAÇÃO E AVALIAÇÃO DE VIABILIDADE

SILVÉRIO TAKAO HOSOMI

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

Orientador:
Prof. Dr. Nelson Barbosa Machado Neto

635.934 4 Hosomi, Silvério Takao.
H827s Sementes de orquídeas: Conservação e
avaliação de viabilidade / Silvério Takao Hosomi –
Presidente Prudente, 2016.
162f.: il.

Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade
do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente,
SP, 2016.
Bibliografia.
Orientador: Nelson Barbosa Machado Neto

1. Orchidaceae. 2. Germinação. 3. Tetrazólio. I.
Título

Campus I Rua José Bongiovani, 700 · Cidade Universitária · CEP 19050 920 · Presidente Prudente SP · Tel|Fax: 18 3229 1000
Campus II Rodovia Raposo Tavares, Km 572 · Bairro Limoeiro · CEP 19067 175 · Presidente Prudente SP · Tel|Fax: 18 3229 2000

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "SEMENTES DE ORQUÍDEAS: CONSERVAÇÃO E AVALIAÇÃO DE VIABILIDADE"

AUTOR: SILVÉRIO TAKAO HOSOMI

ORIENTADOR: 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. Dr. Claudemir Zucareli



UEL – Universidade Estadual de Londrina / Londrina (PR)

Profa. Dra. Fabiana Lima Abrantes



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

Prof. Dr. Nelson Barbosa Machado Neto



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

Profa. Dra. Patrícia Reiners Carvalho



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

Prof. Dr. Ricardo Tadeu de Faria



UEL – Universidade Estadual de Londrina / Londrina (PR)

Data da realização: 19 de dezembro de 2016.

DEDICATÓRIA

À minha família, que compartilhou comigo ao longo desses quatro anos o dia a dia de uma pós-graduação: alegrias, correrias, vitórias, insatisfações, inovações, cansaços, diversões, descobertas e acertos, entre muitas outras vivências... Situações que deixaram marcas em nossas vidas.

AGRADECIMENTOS

Ao professor orientador Dr. Nelson Barbosa Machado Neto, pela colaboração, dedicação e incentivo, por nunca deixar o desânimo tomar conta e sempre contribuir com novas ideias.

Às Profas. Dras. Ceci Castilho Cutódio e Fabiana Lima Abrantes, do Laboratório de Sementes da Unoeste, pela atenção e competência na resolução de dúvidas e problemas na condução dos experimentos.

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

Aos funcionários, técnicos e secretários da Unoeste: Andressa, Cristiane, Daniela, Edna, Edson, Keid, Ivânia, Lucimara, Márcia, Rosângela pela presteza e simpatia.

Aos colegas de curso: Alline, Alyne, Amarildo, Ana Cecília, Angela, Anatoli, Camila, Carlos, Daniela, Graziella, Fernanda, Jéssica, Joyce, José, Gustavo, Leandro, Luciana, Luciana, Luis Eduardo, Mariane, Paulo, Rodrigo e Saulo, pelo companheirismo.

Aos alunos de Iniciação Científica do curso de Bacharelado em Ciências Biológicas: Adriana Mendonça de Oliveira, André Luis Erran Santana, Andréia Macedo Trombini, Gustavo Aparecido Bezerra, Janaína Rogério Rodrigues, Thais Fernanda Silva, Thatiane Bonome de Souza, Samara Silva e Santos e Wilton Felipe Teixeira, pela parceria no desenvolvimento das pesquisas.

Aos alunos estagiários do curso de Ciências Biológicas: Ariane Cristina Rodrigues, Danielle Rodrigues de Souza, Débora Maria Motta Garcia, Gisele Ariane de Lima Silva, Jardel de Oliveira, Luiza Rodenas, Marina Janine Gomes, Melissa da Silva Ferreira, Mirian Karolaine Pires Correia Brasileiro e Renata Espolador, pela colaboração nos trabalhos diários no laboratório.

À UNOESTE – Universidade do Oeste Paulista – pelo financiamento das pesquisas.

Às instituições de ensino, que souberam entender a minha correria entre uma aula e outra: Colégio Átomo, Colégio Objetivo de Rancharia, Colégio Unoeste, Etec Prof. Arruda Mello, Etec Prof. Dr Antonio Eufrásio de Toledo.

Às irmãs mantenedoras do Colégio Cristo Rei, ao diretor Odir Damasceno e à coordenadora pedagógica Maria Cecília Corral Isaac, que desde o início compreenderam e valorizaram minha formação profissional, apoiando de diversas formas minha participação em cursos, congressos e atividades de pesquisa-ação.

Ao casal Miguel e Dirce, da Fazenda Aurora em Taciba, que sempre foi muito prestativo e atencioso recebendo-me no orquidário.

Ao Orchid Seed Stores for Sustainable Use (OSSSU) Project - Darwin Initiative pela parceria na condução do projeto do banco de sementes.

*“Não é o mais forte que sobrevive, nem o
mais inteligente, mas o que melhor se adapta às
mudanças.”*

(CHARLES ROBERT DARWIN)

RESUMO

Sementes de orquídeas: conservação e avaliação de viabilidade

No ano de 2008, o Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade do Oeste Paulista estabeleceu uma parceria com o Orchid Seed Stores for Sustainable Use (OSSSU) Project - Darwin Initiative - para a criação de um banco de sementes de orquídeas na Unoeste, em Presidente Prudente, SP. O objetivo desse empreendimento foi colaborar com a conservação *ex situ* da maior família de plantas que, devido à intensa degradação ambiental e exploração desenfreada, é também uma das mais ameaçadas de extinção. O armazenamento de sementes em bancos de germoplasma se dá em baixas condições de umidade e temperatura e possui grandes vantagens, pois as numerosas e pequenas sementes podem ser conservadas por anos a custos muito reduzidos. No entanto, tal estratégia pressupõe procedimentos como testes de viabilidade para a seleção de lotes a serem conservados, monitoramento da qualidade das sementes armazenadas e eventuais testes de germinação para a produção de indivíduos a serem reintroduzidos em sistemas naturais. Desta forma, o presente trabalho trata do estabelecimento do banco de sementes na Unoeste e de sua importância para a conservação da biodiversidade das orquídeas. Também estão descritos os resultados dos procedimentos de pré-condicionamento, testados com o intuito de melhorar a qualidade do teste de tetrazólio, um dos mais utilizados para a verificação da viabilidade das sementes. Por fim analisa-se o resultado de experimentos para a determinação das temperaturas cardiais de germinação – mínima, ótima e máxima – para algumas espécies de orquídeas do gênero *Cattleya*.

Palavras-chave: Orchidaceae. Germinação. Tetrazólio.

ABSTRACT

Orchid seeds: conservation and viability evaluation

In 2008, the Plant Tissue Culture Laboratory from the Agricultural Sciences College has partnered with Orchid Seed Stores for Sustainable Use (OSSSU) Project - Darwin Initiative - to create an orchid seed bank at Unoeste in Presidente Prudente, São Paulo. The aim of this project was to collaborate with the *ex situ* conservation of the largest plant family, that due to intense environmental degradation and unbridled exploitation, is also one of the most endangered. Seed storage in germplasm banks requires low conditions of humidity and temperature and has great advantages, as the numerous small seeds can last for years at very low costs. However, this strategy demands procedures such as viability tests for selecting lots to be stored, quality monitoring of stored seeds and eventually, germination tests to determine the potential for the production of individuals to be reintroduced into natural systems. Thus, the present work approaches the seed bank establishment at Unoeste and its importance for orchid biodiversity conservation. It also describes the results of preconditioning procedures, tested in order to improve the quality of tetrazolium test, one of the most used for the verification of seed vigor and viability. Finally were analyze the results of experiments to determine the germination cardinal temperatures - minimum, optimum and maximum - for some species of orchids.

Keywords: Orchidaceae. Germination. Tetrazolium.

LISTA DE SIGLAS

AL	Alagoas
BA	Bahia
CE	Ceará
CGIAR	Consultative Group for International Agricultural Research
COPAM	Conselho Estadual de Política Ambiental
CONSEMA	Conselho Estadual de Meio Ambiente
CNCFlora	Centro Nacional de Conservação da Flora
CR	Critically Endangered (Criticamente em Perigo)
DCCA	Dicloroisocianurato de Sódio
DD	Data Deficient (Dados Insuficientes)
Defra	Department for Environment Food & Rural Affairs
dpi	Dots per inch (pontos por polegada)
EM	Endangered (Em perigo)
ES	Espírito Santo
EX	Extinct (Extinta)
EW	Extinct in the Wild (Extinta na Natureza)
GBH	Global Biodiversity Hotspots
GO	Goiás
GSPC	Global Strategy for Plant Conservation
Gt	Germinação total
IOCC	International Orchid Conservation Congress
IVG	Índice de Velocidade de Germinação
IUCN	International Union for Conservation of Nature
LC	Least Concern (Menos Preocupante)
µg	Micrograma
MG	Minas Gerais
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MDGs	Millennium Development Goals
MS	Murashige e Skoog
MS	Mato Grosso do Sul
MT	Mato Grosso
NaClO	Hipoclorito de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
NE	Not Evaluated (Não Avaliada)
NT	Near Threatened (Quase Ameaçada)
OSSSU	Orchid Seed Stores for Sustainable Use
PA	Pará
PB	Paraíba
PE	Pernambuco

pH	Potencial Hidrogeniônico
PR	Paraná
Pr	Probit
RJ	Rio de Janeiro
RN	Rio Grande do Norte
RS	Rio Grande do Sul
SC	Santa Catarina
SEMA	Secretaria do Meio Ambiente
SMA	Secretaria do Meio Ambiente
SP	São Paulo
T	Temperatura (°C)
Tm	Tempo médio
Tmin	Temperatura mínima
TM	Temperatura máxima
To	Temperatura ótima
TO	Tocantins
U	Sincronismo
UFPR	Universidade Federal do Paraná
UNDP	United Nations Development Program
VU	Vulnerable (Vulnerável)
WOC	World Orchid Conference

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 2.1 - Sementes de *Cattleya tigrina* pré-condicionadas em solução de sacarose, submetidas ao teste de tetrazólio a 1%, tamponadas, pelo período de 24 horas. I – Imagem digitalizada da lâmina, com referência da escala da régua em milímetros; II – Campo ampliado da imagem da lâmina onde: A- sementes não viáveis (coloração branca), B- palha (sementes sem embrião) e C- sementes viáveis (coloração vermelha).....42
- FIGURA 2.2 - Germinação assimbiótica acumulada (%) e IVG – Índice de Velocidade de Germinação das amostras de sementes de *Cattleya labiata* e *Cattleya tigrina* semeadas em meio MS.....43
- FIGURA 2.3 - Germinação assimbiótica de sementes de orquídeas da espécie *Cattleya tigrina* e *Cattleya labiata* em meio MS por 42 dias. I-1- fotografia ao sétimo dia após a semeadura de *Cattleya tigrina*; I-2 fotografia ao vigésimo primeiro dia após a semeadura de *Cattleya tigrina* onde A- Semente não germinada; B- protocormo com rizóides em desenvolvimento. II-1- fotografia ao sétimo dia após a semeadura de *Cattleya labiata*; II-2 fotografia ao vigésimo primeiro dia após a semeadura de *Cattleya labiata*.....44
- FIGURA 2.4 - Viabilidade de sementes (%) de *Cattleya labiata* e *Cattleya tigrina*, submetidas a diferentes concentrações da solução de tetrazólio e diferentes tempos de exposição. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si na mesma amostra de sementes, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.46
- FIGURA 2.5 - Viabilidade de sementes (%) de *Cattleya labiata*, submetidas a quatro condições de pré-condicionamento; I- viabilidade das sementes em diferentes concentrações da solução de tetrazólio; II- viabilidade das sementes em diferentes tempos de exposição a solução de tetrazólio. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si no mesmo tratamento de pré-condicionamento, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.....47
- FIGURA 2.6 - Viabilidade de sementes (%) de *Cattleya tigrina*, submetidas a 4 condições de pré-condicionamento; I- viabilidade das sementes em diferentes concentrações da solução de tetrazólio; II- viabilidade das sementes em diferentes tempos de exposição a solução de tetrazólio. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si no mesmo tratamento de pré-condicionamento, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.....48
- FIGURA 2.7 - Viabilidade de sementes (%) de *Cattleya labiata* (I) e *Cattleya tigrina* (II), submetidas a diferentes concentrações da solução de tetrazólio e em diferentes tempos de exposição a solução de tetrazólio. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si na mesma concentração de solução de tetrazólio, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.49
- FIGURA 2.8 - Sementes de *Cattleya labiata* submetidas ao teste de tetrazólio em diferentes condições de pré-condicionamento, concentração dos sais de tetrazólio, tempo de exposição e uso de solução tampão. I – Sementes sem pré-condicionamento, submetidas a solução de tetrazólio a 0,1% por 3h; II – Sementes pré-condicionadas em água, submetidas a solução de tetrazólio a 1,0% por 24h; III –

Sementes pré-condicionadas em solução de glicose a 10%, submetidas a solução de tetrazólio a 1,0% por 24h; IV – Sementes pré-condicionadas em solução de sacarose a 10%, submetidas a solução tamponada de tetrazólio a 1,0% por 24h....	51
FIGURA 3.1 - Quadro demonstrando a equivalência do valor de probit (Pr) e os valores de porcentagem de viabilidade pelo teste de tetrazólio.	71
FIGURA 3.2 - Imagens digitalizadas do teste de tetrazólio. A- sementes viáveis, B- sementes mortas. IA – teste de tetrazólio de <i>C. caetensis</i> em fevereiro de 2009, IB- teste de tetrazólio de <i>C. caetensis</i> de janeiro de 2016, IIA – teste de tetrazólio de <i>C. endsfeldzii</i> de setembro de 2008, IIB – teste de tetrazólio de <i>C. endsfeldzii</i> de janeiro de 2016, IIIA- teste de tetrazólio <i>C. hegeriana</i> de julho de 2008, III-B – teste de tetrazólio de <i>C. hegeriana</i> de janeiro de 2016.....	73
FIGURA 3.3 - Valores de P_{50} calculados para 36 amostras de sementes de orquídeas do gênero <i>Cattleya</i> . A- Sementes de vida longa; B- Sementes de vida média; C- Sementes de vida curta.	78
FIGURA 4.1 - Porcentagem de germinação assimbiótica das amostras de sementes de I- <i>Cattleya purpurata</i> , II- <i>Cattleya walkeriana</i> , III- <i>Cattleya warneri</i> , IV- <i>Cattleya labiata</i> , V- <i>Cattleya amethystoglossa</i> , VI- <i>Cattleya lodigesii</i> , VII- <i>Cattleya brevicaulis</i> , VIII- <i>Cattleya jongheana</i> , IX- <i>Cattleya schilleriana</i> , X- <i>Cattleya tigrina</i> , XI- <i>Cattleya tenebrosa</i> e XII- <i>Cattleya intermedia</i> semeadas em meio MS em diferentes temperaturas (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 °C).	98
FIGURA 4.2 - Valores de germinação total e IVG-Índice de Velocidade de Germinação para sementes de orquídeas semeadas em condições assimbióticas no meio MS em diferentes temperaturas: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 °C. I- <i>C. purpurata</i> , II- <i>C. walkeriana</i> , III- <i>C. warneri</i> , IV- <i>C. labiata</i> , V- <i>C. amethystoglossa</i> , VI- <i>C. lodigesii</i> , VII- <i>C. brevicaulis</i> , VIII- <i>C. jongheana</i> , IX- <i>C. schilleriana</i> , X- <i>C. leopoldii</i> , XI- <i>C. tenebrosa</i> e XII- <i>C. intermedia</i>	106
FIGURA 4.3 - Frequências relativas de germinação das sementes de <i>Cattleya purpurata</i> , semeadas em meio MS em diferentes temperaturas (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 °C). As setas representam o tempo médio de germinação para cada temperatura (Gt- Porcentagem da germinação total, Tm-Tempo médio de germinação e U-Sincronismo na germinação).	109
FIGURA 4.5 - Germinação assimbiótica de sementes de <i>Cattleya purpurata</i> em meio MS em diferentes temperaturas (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 °C), após 49 dias após a semeadura.....	110
FIGURA 4.6 - Frequências relativas de germinação das sementes de <i>Cattleya walkeriana</i> , semeadas em meio MS em diferentes temperaturas: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 °C. As setas representam o tempo médio de germinação para cada temperatura (Gt-Porcentagem da germinação total, Tm- Tempo médio de germinação e U-Sincronismo na germinação).	113
FIGURA 4.7 - Germinação assimbiótica de sementes de <i>Cattleya walkeriana</i> em meio MS em diferentes temperaturas (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 °C), 21 dias após a semeadura.....	114

FIGURA 4.8 - Germinação assimbiótica de sementes de <i>Cattleya walkeriana</i> em meio MS em diferentes temperaturas (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 °C), 49 dias após a semeadura.....	114
FIGURA 4.9 - Frequências relativas de germinação das sementes de <i>Cattleya warneri</i> , semeadas em meio MS em diferentes temperaturas: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 °C. As setas representam o tempo médio de germinação para cada temperatura (Gt- Porcentagem da germinação total, Tm- Tempo médio de germinação e U- Sincronismo na germinação).	116
FIGURA 4.10 - Germinação assimbiótica de sementes de <i>Cattleya warneri</i> em meio MS em diferentes temperaturas (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 °C), 21 dias após a semeadura.	117
FIGURA 4.11 - Germinação assimbiótica de sementes de <i>Cattleya warneri</i> em meio MS em diferentes temperaturas (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 °C), 49 dias após a semeadura.	117
FIGURA 4.12 - Frequências relativas de germinação das sementes de <i>Cattleya labiata</i> , semeadas em meio MS em diferentes temperaturas: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 °C. As setas representam o tempo médio de germinação para cada temperatura (Gt- Porcentagem da germinação total, Tm- Tempo médio de germinação e U- Sincronismo na germinação).	119
FIGURA 4.13 - Germinação assimbiótica de sementes de <i>Cattleya labiata</i> em meio MS em diferentes temperaturas (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 °C), 21 dias após a semeadura.	120
FIGURA 4.14 - Germinação assimbiótica de sementes de <i>Cattleya labiata</i> em meio MS em diferentes temperaturas (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 °C), 49 dias após a semeadura.	120
FIGURA 4.15 - Frequências relativas de germinação das sementes de <i>Cattleya amethystoglossa</i> , semeadas em meio MS em diferentes temperaturas: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 °C. As setas representam o tempo médio de germinação para cada temperatura (Gt- Porcentagem da germinação total, Tm- Tempo médio de germinação e U- Sincronismo na germinação).	122
FIGURA 4.16 - Germinação assimbiótica de sementes de <i>Cattleya amethystoglossa</i> em meio MS em diferentes temperaturas (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 °C), 21 dias após a semeadura.	123
FIGURA 4.17 - Germinação assimbiótica de sementes de <i>Cattleya amethystoglossa</i> em meio MS em diferentes temperaturas (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 °C), 49 dias após a semeadura.	123
FIGURA 4.18 - Frequências relativas de germinação das sementes de <i>Cattleya loddigesii</i> , semeadas em meio MS em diferentes temperaturas: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 °C. As setas representam o tempo médio de germinação para cada temperatura (Gt- Porcentagem da germinação total, Tm- Tempo médio de germinação e U- Sincronismo na germinação).	125

FIGURA 4.19 - Germinação assimbiótica de sementes de <i>Cattleya loddigesii</i> em meio MS em diferentes temperaturas (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 °C), 21 dias após a semeadura.....	126
FIGURA 4.20 - Germinação assimbiótica de sementes de <i>Cattleya loddigesii</i> em meio MS em diferentes temperaturas (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 °C), 49 dias após a semeadura.....	126
FIGURA 4.21 - Frequências relativas de germinação das sementes de <i>Cattleya brevicaulis</i> , semeadas em meio MS em diferentes temperaturas: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 °C. As setas representam o tempo médio de germinação para cada temperatura (Gt- Porcentagem da germinação total, Tm-Tempo médio de germinação e U-Sincronismo na germinação).....	128
FIGURA 4.22 - Germinação assimbiótica de sementes de <i>Cattleya brevicaulis</i> em meio MS em diferentes temperaturas (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 °C), 21 dias após a semeadura.....	129
FIGURA 4.23 - Germinação assimbiótica de sementes de <i>Cattleya brevicaulis</i> em meio MS em diferentes temperaturas (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 °C), 49 dias após a semeadura.....	129
FIGURA 4.24 - Frequências relativas de germinação das sementes de <i>Cattleya jongheana</i> , semeadas em meio MS em diferentes temperaturas: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 °C. As setas representam o tempo médio de germinação para cada temperatura (Gt- Porcentagem da germinação total, Tm-Tempo médio de germinação e U-Sincronismo na germinação).....	131
FIGURA 4.25 - Germinação assimbiótica de sementes de <i>Cattleya jongheana</i> em meio MS em diferentes temperaturas (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 °C), 21 dias após a semeadura.....	132
FIGURA 4.26 - Germinação assimbiótica de sementes de <i>Cattleya jongheana</i> em meio MS em diferentes temperaturas (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 °C), 49 dias após a semeadura.....	132
FIGURA 4.27 - Frequências relativas de germinação das sementes de <i>Cattleya schilleriana</i> , semeadas em meio MS em diferentes temperaturas: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 °C. As setas representam o tempo médio de germinação para cada temperatura (Gt- Porcentagem da germinação total, Tm-Tempo médio de germinação e U-Sincronismo na germinação).....	134
FIGURA 4.28 - Germinação assimbiótica de sementes de <i>Cattleya schilleriana</i> em meio MS em diferentes temperaturas (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 °C), 21 dias após a semeadura.....	135
FIGURA 4.29 - Germinação assimbiótica de sementes de <i>Cattleya schilleriana</i> em meio MS em diferentes temperaturas (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 °C), 49 dias após a semeadura.....	135
FIGURA 4.30 - Frequências relativas de germinação das sementes de <i>Cattleya tigrina</i> , semeadas em meio MS em diferentes temperaturas: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 °C. As setas representam o tempo médio de germinação para cada	

temperatura (Gt-Porcentagem da germinação total, Tm-Tempo médio de germinação e U-Sincronismo na germinação).....	137
FIGURA 4.31 - Germinação assimbiótica de sementes de <i>Cattleya tigrina</i> em meio MS em diferentes temperaturas (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 °C), 21 dias após a semeadura.	138
FIGURA 4.32 - Germinação assimbiótica de sementes de <i>Cattleya tigrina</i> em meio MS em diferentes temperaturas (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 °C), 49 dias após a semeadura.	138
FIGURA 4.33 - Frequências relativas de germinação das sementes de <i>Cattleya tenebrosa</i> , semeadas em meio MS em diferentes temperaturas: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 °C. As setas representam o tempo médio de germinação para cada temperatura (Gt-Porcentagem da germinação total, Tm-Tempo médio de germinação e U-Sincronismo na germinação).....	140
FIGURA 4.34 - Germinação assimbiótica de sementes de <i>Cattleya tenebrosa</i> em meio MS em diferentes temperaturas (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 °C), 21 dias após a semeadura.....	141
FIGURA 4.35 - Germinação assimbiótica de sementes de <i>Cattleya tenebrosa</i> em meio MS em diferentes temperaturas (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 °C), 49 dias após a semeadura.....	141
FIGURA 4.36 - Frequências relativas de germinação das sementes de <i>Cattleya intermedia</i> , semeadas em meio MS em diferentes temperaturas: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 °C. As setas representam o tempo médio de germinação para cada temperatura (Gt-Porcentagem da germinação total, Tm-Tempo médio de germinação e U-Sincronismo na germinação).....	143
FIGURA 4.37 - Germinação assimbiótica de sementes de <i>Cattleya intermedia</i> em meio MS em diferentes temperaturas (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 °C), 21 dias após a semeadura.....	144
FIGURA 4.38 - Germinação assimbiótica de sementes de <i>Cattleya intermedia</i> em meio MS em diferentes temperaturas (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 °C), 49 dias após a semeadura.....	144
FIGURA 4.39 - Sementes e protocormos de <i>Cattleya brevicaulis</i> , submetidas ao teste de tetrazólio antes e após o período de germinação assimbiótico em meio MS em diferentes temperaturas. A- sementes não viáveis (coloração branca) e B- sementes viáveis (coloração vermelha).	147

LISTA DE TABELAS

TABELA 2.1 - Viabilidade de sementes (%) de <i>Cattleya labiata</i> e <i>Cattleya tigrina</i> , em resposta a diferentes pré-condicionamentos e ao uso de solução tampão.....	45
TABELA 3.1 - Relação dos lotes de sementes das espécies de orquídeas utilizados, distribuição geográfica e identificação dos biomas e hábitos, grau de ameaça (EX- Extinta, EW- Extinta na natureza, CR- Criticamente em perigo, EN- Em perigo, VU- Vulnerável, NT-Quase ameaçada, LC- Menos preocupante, DD- Dados insuficientes, NE-Não avaliada).....	67
TABELA 3.2 - Avaliação da viabilidade dos lotes de sementes de <i>Cattleya</i> pelo teste de tetrazólio, antes e após o armazenamento, com valores de P_{50}	75
TABELA 4.1 - Relação dos lotes de sementes das espécies de orquídeas utilizados no estudo de temperatura cardeal, data de coleta dos frutos, distribuição geográfica e identificação dos biomas e hábitos, grau de ameaça (EX- Extinta, EW- Extinta na natureza, CR- Criticamente em perigo, EN- Em perigo, VU-Vulnerável, NT-Quase ameaçada, LC- Menos preocupante, DD- Dados insuficientes, NE-Não avaliada)...	93
TABELA 4.2 - Valores de IVG-Índice de Velocidade de Germinação calculados a partir da germinação assimbiótica das sementes de orquídeas <i>C. purpurata</i> , <i>C. walkeriana</i> , <i>C. warneri</i> , <i>C. labiata</i> , <i>C. amethystoglossa</i> , <i>C. loddigesii</i> , <i>C. brevicaulis</i> , <i>C. jongheana</i> , <i>C. schilleriana</i> , <i>C. leopoldii</i> , <i>C. tenebrosa</i> e <i>C.intermedia</i> em meio MS em diferentes temperaturas.....	105
TABELA 4.3 - Valores de Tempo médio, Velocidade de germinação, U-Sincronismo calculados a partir da germinação assimbiótica das sementes da orquídea <i>Cattleya purpurata</i> , em meio MS em diferentes temperaturas.	108
TABELA 4.4 - Valores de Tempo médio, Velocidade de germinação, U-Sincronismo calculados a partir da germinação assimbiótica das sementes da orquídea <i>Cattleya walkeriana</i> , em meio MS em diferentes temperaturas.	112
TABELA 4.5 - Valores de Tempo médio, Velocidade de germinação, U-Sincronismo calculados a partir da germinação assimbiótica das sementes da orquídea <i>Cattleya warneri</i> , em meio MS em diferentes temperaturas.....	115
TABELA 4.6 - Valores de Tempo médio, Velocidade de germinação, U-Sincronismo calculados a partir da germinação assimbiótica das sementes da orquídea <i>Cattleya labiata</i> , em meio MS em diferentes temperaturas.....	118
TABELA 4.7 - Valores de Tempo médio, Velocidade de germinação, U-Sincronismo calculados a partir da germinação assimbiótica das sementes da orquídea <i>Cattleya amethystoglossa</i> , em meio MS em diferentes temperaturas.....	121
TABELA 4.8 - Valores de Tempo médio, Velocidade de germinação, U-Sincronismo calculados a partir da germinação assimbiótica das sementes da orquídea <i>Cattleya loddigesii</i> , em meio MS em diferentes temperaturas.....	124
TABELA 4.9 - Valores de Tempo médio, Velocidade de germinação, U-Sincronismo calculados a partir da germinação assimbiótica das sementes da orquídea <i>Cattleya brevicaulis</i> , em meio MS em diferentes temperaturas.....	127

TABELA 4.10 - Valores de Tempo médio, Velocidade de germinação, U-Sincronismo calculados a partir da germinação assimbiótica das sementes da orquídea <i>Cattleya jongheana</i> , em meio MS em diferentes temperaturas.....	130
TABELA 4.11 - Valores de Tempo médio, Velocidade de germinação, U-Sincronismo calculados a partir da germinação assimbiótica das sementes da orquídea <i>Cattleya schilleriana</i> , em meio MS em diferentes temperaturas.....	133
TABELA 4.12 - Valores de Tempo médio, Velocidade de germinação, U-Sincronismo calculados a partir da germinação assimbiótica das sementes da orquídea <i>Cattleya tigrina</i> , em meio MS em diferentes temperaturas.....	136
TABELA 4.13 - Valores de Tempo médio, Velocidade de germinação, U-Sincronismo calculados a partir da germinação assimbiótica das sementes da orquídea <i>Cattleya tenebrosa</i> , em meio MS em diferentes temperaturas.....	139
TABELA 4.14 - Valores de Tempo médio, Velocidade de germinação, U-Sincronismo calculados a partir da germinação assimbiótica das sementes da orquídea <i>Cattleya intermedia</i> , em meio MS em diferentes temperaturas.....	142
TABELA 4.15 - Determinação da temperatura cardeal das sementes de orquídeas <i>Cattleya</i> germinadas em condições assimbiótica em meio de cultura MS.	146
TABELA 4.16 - Viabilidade das sementes pelo teste de tetrazólio em porcentagem (%) antes da germinação assimbiótica (início) e logo após o período de 49 dias de germinação assimbiótica em meio MS e em diferentes temperaturas.	148

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	16
1. CAPÍTULO I: CONSERVAÇÃO <i>EX SITU</i> DE ORQUÍDEAS – BANCO DE SEMENTES.....	18
<i>EX SITU</i> ORCHID CONSERVATION: SEED BANK	19
1.1 Introdução	20
1.2 Desenvolvimento.....	22
1.3 Considerações Finais.....	28
REFERÊNCIAS.....	29
2. CAPÍTULO II: CONDIÇÕES DO TESTE DE TETRAZÓLIO NA AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE SEMENTES DE ORQUÍDEAS*.....	32
TETRAZOLIUM TEST CONDITIONS IN THE EVALUATION OF ORCHID SEEDS VIABILITY	33
2.1 Introdução	34
2.2 Objetivos	38
2.3 Material e Métodos.....	39
2.4 Resultados e Discussão.....	42
2.5 Conclusões.....	52
REFERÊNCIAS.....	53
3. CAPÍTULO III: PREDIÇÃO DA LONGEVIDADE DE SEMENTES DE ORQUÍDEAS DO GÊNERO <i>Cattleya</i> ARMAZENADAS EM BANCO DE SEMENTES.	56
PHYSIOLOGICAL QUALITY EVALUATION OF <i>Cattleya</i> SEEDS STORED AT UNOESTE'S ORCHID SEED BANK THROUGH TETRAZOLIUM TEST	57
3.1 Introdução	58
3.2 Objetivos	64
3.3 Material e Métodos.....	65
3.4 Resultados e Discussão.....	72
3.5 Conclusões.....	79
REFERÊNCIAS.....	80
4. CAPÍTULO IV: DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA CARDEAL PARA GERMINAÇÃO ASSIMBIÓTICA DE SEMENTES DE <i>Cattleya</i>	84
CARDINAL TEMPERATURE DETERMINATION FOR ASSIMBIOTIC GERMINATION OF ORCHID SEEDS.....	85
4.1 Introdução	86
4.2 Objetivos	90
4.3 Material e Métodos.....	91

4.4 Resultados e Discussão	97
4.5 Conclusões.....	150
REFERÊNCIAS	151
CONCLUSÕES GERAIS.....	156
REFERÊNCIAS GERAIS	157

INTRODUÇÃO GERAL

As mudanças climáticas, o desmatamento e a exploração comercial irregular são algumas das mais importantes ameaças à biodiversidade na atualidade. A degradação de habitats e a interferência humana na intrincada rede de relações que os organismos estabelecem entre si nos ecossistemas ameaçam a sobrevivência até mesmo das espécies ainda não conhecidas e descritas pelo homem (SEATON et al., 2010). A elaboração das chamadas listas vermelhas, que classificam as espécies de acordo com diferentes graus de ameaça, constituem uma estratégia de conscientização e ao mesmo tempo indicam prioridades para a elaboração de estratégias de conservação (ASHMORE; HAMILTON; OFFORD, 2011).

A conservação *in situ*, realizada na natureza, nem sempre é possível ou suficiente para garantir a sobrevivência das espécies. Por isso, cada vez mais se ampliam as estratégias *ex situ*, que compreendem a manutenção de indivíduos ou tecidos em ambientes não naturais para a espécie em questão. A integração entre os dois modos de conservação parece ser o caminho mais adequado para combater a perda de biodiversidade (MIRENDA, 2008; SEATON; PRITCHARD, 2011).

As sementes de orquídeas são muito pequenas e bastante numerosas, o que facilita seu armazenamento em bancos de germoplasma, em condições de baixa temperatura e umidade. No entanto, mesmo em condições favoráveis, a viabilidade da sementes, isto é, sua capacidade de germinação e produção de novos indivíduos, pode ser afetada. Para identificar a qualidade dos lotes de sementes destinados à conservação, determinar as melhores condições de armazenamento e monitorar periodicamente o efeito do armazenamento sobre a qualidade das sementes, são aplicados testes de viabilidade, entre os quais os mais comuns são os testes de germinação e de tetrazólio.

Especificamente para sementes de orquídeas o teste de tetrazólio é o mais indicado, pois fornece resultados mais rápidos. Testes de germinação em sementes de orquídeas são demorados e possuem custos elevados, uma vez que a germinação necessita de associação com fungos micorrízicos ou meios de cultura de composição particular para cada espécie (HOSOMI et al., 2011).

A inclusão de procedimentos de pré-condicionamento nos protocolos do teste de tetrazólio – cujas variantes ainda carecem de informação para a maioria das espécies – pode aumentar sua eficiência, proporcionando alterações teciduais que garantam a melhor infiltração do tetrazólio na semente e, por conseguinte, a melhor visualização das sementes viáveis.

Outro estudo que pode aumentar a eficiência dos procedimentos de conservação *ex situ* em bancos de sementes de orquídeas é a determinação das temperaturas cardeais de germinação, que não foram estabelecidas para a maioria das espécies. Periodicamente as sementes armazenadas em bancos podem ser germinadas para originar plântulas destinadas à translocação e recomposição da flora, portanto, quanto maior a taxa de germinação, maior a eficácia do procedimento.

Desta forma, o presente trabalho apresenta quatro capítulos. O primeiro traz uma revisão sobre a importância dos bancos de sementes, da integração das estratégias *in situ* e *ex situ* para conservação da biodiversidade e relata especificamente o histórico da constituição do banco de sementes da Unoeste, em parceria com o OSSSU Project (Orchid Seed Stores for Sustainable Use). Já o segundo relata um ensaio para delinear os protocolos mais adequados para o pré-condicionamento das sementes de duas espécies de orquídeas, visando melhorar a qualidade de detecção de viabilidade do teste de tetrazólio. O terceiro trata da avaliação fisiológica de sementes de orquídeas armazenadas no banco Unoeste, que embasou o cálculo da previsão de sua longevidade. Por fim, o último artigo descreve os experimentos realizados com doze espécies do gênero *Cattleya* para determinar as temperaturas cardeais de germinação. A definição das melhores temperaturas para a germinação assimbiótica em meio de cultura MS contribui para otimizar os resultados do teste de germinação para cada espécie analisada.

1. CAPÍTULO I: CONSERVAÇÃO *EX SITU* DE ORQUÍDEAS – BANCO DE SEMENTES

RESUMO - A intensa degradação de habitats pela ação humana tem sido um dos fatores decisivos para a inserção de diversas espécies da família Orchidaceae nas chamadas listas vermelhas, que reúnem seres vivos com diferentes graus de ameaça de extinção. Nesse sentido, apresenta-se neste trabalho uma revisão das diversas estratégias para a conservação de espécies de orquídeas que vem sendo desenvolvidas pela comunidade científica, as quais podem se dar *in situ*, isto é, na natureza, ou *ex situ*, em ambientes não naturais para a espécie em questão. A conservação *ex situ* de plantas compreende a manutenção de sementes, tecidos ou indivíduos em bancos de germoplasma, sendo os bancos de sementes uma das estratégias mais viáveis para a conservação de orquídeas. Nessas coleções, sementes de muitas espécies podem ser mantidas em condições baixas de umidade e temperatura sem perder a viabilidade por longo prazo, ocupando pouco espaço e a custos relativamente reduzidos. Desta forma, concluiu-se que, apesar de os bancos de sementes não serem adequados para as espécies cujas sementes são recalcitrantes, eles constituem uma das mais importantes estratégias de conservação *ex situ* a ser utilizada, de modo integrado a outras, visando garantir a manutenção da biodiversidade vegetal.

Palavras-chave: Congelamento. Germoplasma. Orchidaceae.

EX SITU ORCHID CONSERVATION: SEED BANK

ABSTRACT- Intense degradation of habitats by human action is one of the decisive factors for the inclusion of several Orchidaceae family species in red lists, which assemble organisms at different degrees of endanger. Accordingly, it is presented on this paper, a review of several strategies promoted by scientific community to improve orchid species conservation, which may occur *in situ*, i.e. in nature, or *ex situ*, in non-natural environments for the species in question. *Ex situ* plant conservation comprises maintaining seeds, tissues or specimens in germplasm banks, being seed banks one of the most feasible strategies for orchids conservation. In these collections, seeds of many species can be kept at low humidity and temperature without losing long-term viability, taking up little space, at relatively low costs. In this way it was concluded that, although seed banks are not suitable for species whose seeds are recalcitrant, they are one of the most important *ex situ* conservation strategies to be used integrated with others, to ensure the maintenance of plant biodiversity.

Key words: Freezing. Germplasm. Orchidaceae.

1.1 Introdução

A família Orchidaceae é a segunda maior dentre as plantas, com cerca de 26.000 espécies distribuídas em 736 gêneros (CHASE et al., 2015), correspondendo a um terço das monocotiledôneas e a cerca de 8 a 10% de todas as plantas. Ela ocorre em todos os continentes, exceto na Antártida, sendo mais diversificada e numerosa nas regiões tropicais e subtropicais. A flora de orquídeas de muitos países é pouco conhecida; são descritas aproximadamente 500 espécies novas por ano (CHASE et al., 2015).

Há muito tempo as orquídeas vêm fascinando os pesquisadores, seja por sua diversidade de morfologia floral e vegetativa, por suas diferenciadas síndromes de polinização ou ainda por suas diferentes estratégias reprodutivas desenvolvidas ao longo de sua história evolutiva (FAY; CHASE, 2009).

Utilizadas principalmente para ornamentação, as orquídeas são intensamente exploradas, o que, juntamente com a agressiva degradação de seus habitats, têm resultado na extinção localizada de populações nativas. Assim, faz-se necessário o desenvolvimento de estratégias de conservação, de modo a garantir a preservação da biodiversidade desse grupo de plantas especialmente ameaçadas.

As estratégias de conservação de recursos genéticos envolvem duas formas: conservação *in situ* e conservação *ex situ*. A conservação vegetal *ex situ* compreende a manutenção de plantas, sementes ou tecidos em bancos de germoplasma. Esse tipo de estratégia tem por objetivo evitar a perda de recursos genéticos, preservar fontes de genes para uso futuro, além de colecionar, identificar e caracterizar genótipos para o uso no melhoramento. Existem bancos de germoplasma *in vivo*, isto é, áreas que reúnem coleções de plantas vivas, mantidas em jardins botânicos, arboretos, ou próximas a bancos de sementes. No entanto, além de necessitarem de um espaço físico muito maior e de cuidados constantes, tais estruturas estão mais sujeitas a intempéries e desastres naturais, como incêndios, pragas e doenças. Outras formas de conservação *ex situ* do germoplasma são os bancos de sementes e a cultura de tecidos (conservação *in vitro*), esta indicada de modo especial para plantas que não produzem sementes, as produzem em pequenas quantidades ou ainda aquelas cujas sementes são recalcitrantes (KOOPOWITZ; HAWKINS, 2012).

Já a conservação *in situ* ocorre em comunidades naturais como parques nacionais, reservas biológicas, reservas genéticas, estações ecológicas e refúgios de vida silvestre. Nesses ecossistemas, vegetais, animais e microrganismos interagem entre si, o que é fundamental para manter o equilíbrio da biosfera. A conservação *in situ* de recursos genéticos de certas espécies prioritárias é o primeiro passo para a conservação do próprio ecossistema, pois se traduz em benefícios adicionais como estabilização e melhoria do solo, diminuição da erosão e obtenção de águas mais limpas. Esse tipo de estratégia é a mais adequada para preservar espécies florestais e também parentes silvestres de espécies cultivadas (KAUTH; KANE; VENDRAME, 2011). De modo especial, aplica-se a espécies que apresentam distribuição ecológica restrita, baixa densidade populacional, baixa capacidade de regeneração natural, habitat vulnerável ou ameaçado. Sua grande vantagem é a contínua adaptação ao ambiente, uma vez que os indivíduos são mantidos em seu habitat original, garantindo a constante influência das forças evolutivas (BARBIERI, 2003).

Somente na natureza pode ocorrer o processo de adaptação evolutiva de uma população localizada numa comunidade sujeita às alterações ambientais (PRIMACK; RODRIGUES, 2001). Por esse motivo, a princípio, a conservação *in situ* pode não ser eficiente quando os indivíduos remanescentes se localizam fora das áreas protegidas ou ainda no caso de pequenas populações. Todavia, em grande parte dos trópicos, incluindo o Brasil, não se conhece o tamanho das populações da maior parte das espécies de plantas. Na verdade, existem até mesmo inúmeras espécies que nem foram nomeadas ou descritas. Desta forma, a conservação *in situ* se configura como a principal estratégia para tais espécies, permitindo que elas possam ao menos ser conhecidas e estudadas.

Os esforços de conservação *ex situ* são parte importante de uma estratégia de conservação integrada para proteger as espécies ameaçadas. As estratégias de conservação *ex situ* e *in situ* são abordagens complementares. Indivíduos de populações *ex situ* podem ser periodicamente integrados à natureza para aumentar os esforços de conservação *in situ*.

Além da produção de plantas, os jardins botânicos e institutos de pesquisas têm desenvolvido coleções de sementes, por vezes chamadas de bancos de sementes, retiradas do ambiente natural ou de plantas cultivadas. Estocadas nesses locais sob baixas temperatura e umidade, sementes de muitas espécies de

plantas ainda germinam depois de certo tempo. Tal habilidade das sementes em permanecerem quiescentes ou dormentes é extremamente valiosa para os esforços de conservação *ex situ*, porque permite que as sementes de um grande número de espécies raras sejam resfriadas e estocadas em um pequeno espaço, com pouca supervisão e a baixo custo. Existem no mundo mais de cinquenta bancos de sementes reconhecidos, muitos deles localizados em países em desenvolvimento, com suas atividades coordenadas pelo Grupo Consultor de Pesquisa Agrícola Internacional (CGIAR).

Embora os bancos de sementes possuam um grande potencial para a conservação de espécies, eles também apresentam alguns problemas. Dificuldades no fornecimento de energia ou na manutenção de equipamentos podem danificar uma coleção inteira de indivíduos congelados. Além disso, na estocagem a frio, as sementes perdem gradativamente sua habilidade de germinação devido à exaustão de suas reservas energéticas e ao acúmulo de deteriorações danosas. Para superar esta deterioração gradativa da qualidade da semente, amostras devem ser periodicamente germinadas, as plantas adultas cultivadas até a maturidade, e novas amostras de sementes estocadas (PRIMACK; RODRIGUES, 2001).

1.2 Desenvolvimento

Muitas espécies de plantas estão ameaçadas de extinção ao redor do mundo devido ao desaparecimento gradual de ecossistemas terrestres naturais, fruto da intervenção humana. Além da invasão de espécies exóticas e do desmatamento da vegetação para a agricultura, que resulta em erosão e salinização do solo, mais recentemente a mudança climática tem aparecido como uma nova e significativa ameaça (REED et al., 2011). Mais de 50% das espécies de plantas do mundo são endêmicas em trinta e quatro *hotspots* globais de biodiversidade (GBH - Global Biodiversity Hotspots), que já cobriram 15,7% da superfície terrestre do planeta e agora se encontram reduzidos a apenas 2,3%. Um grande número de espécies endêmicas dessas áreas encontra-se em crescente ameaça de extinção. A Lista Vermelha de Espécies de Plantas Ameaçadas, publicada em 1998, pela primeira vez, pela União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN -

International Union for Conservation of Nature), atualmente inclui 11.577 espécies, sendo 10.875 de plantas com flores (IUCN, 1998; IUCN, 2016).

São necessárias iniciativas desenvolvidas e dirigidas por agências internacionais para a conservação integrada de espécies vegetais raras e ameaçadas. A conservação global da biodiversidade significa maior segurança para os programas relacionados à produção agrícola e à conservação biológica, bem como para a segurança alimentar, constituindo-se em um componente essencial para o desenvolvimento sustentável e para a própria manutenção da diversidade genética das espécies de importância socioeconômica.

Nos termos da Convenção sobre Diversidade Biológica, a conservação *in situ* é definida como sendo a conservação dos ecossistemas e dos habitats naturais, a manutenção e a reconstituição de populações viáveis de espécies nos seus ambientes naturais e, no caso de espécies domesticadas e cultivadas, nos ambientes onde desenvolveram seus caracteres distintos. Já a conservação *ex situ*, por sua vez, envolve a manutenção, fora do habitat natural, de uma representatividade da biodiversidade, de importância científica ou econômico-social, inclusive para o desenvolvimento de programas de pesquisa, particularmente aqueles relacionados ao melhoramento genético (MIRENDA, 2011).

A Estratégia Global para a Conservação de Plantas (GSPC - Global Strategy for Plant Conservation), assinada por mais de 180 países em 2002, visa conter a perda iminente de biodiversidade através da definição de metas para a compreensão e conservação da diversidade de plantas, promoção do uso sustentável, educação ambiental, além do fornecimento e construção de estruturas para apoiar a conservação de plantas (GSPC, 2010). A meta 8 deste plano recomenda a criação de coleções *ex situ para* pelo menos 75% das espécies ameaçadas, preferencialmente no país de origem, sendo que no mínimo 20% delas deverão estar inseridas em programas de reabilitação ecológica até 2020, como observado no Programa de Desenvolvimento da Organização das Nações Unidas (UNDP - United Nations Development Program), (UNDP, 2010a). Outra iniciativa desenvolvida pelos Estados Membros da Organização das Nações Unidas e por mais de 20 organizações internacionais foram as Metas de Desenvolvimento do Milênio (MDGs - The Millennium Development Goals). Das oito metas dos MDGs, sete foram destinadas a reduzir significativamente a taxa de perda de biodiversidade até 2015 (UNDP, 2010b).

Apesar da conservação de plantas ter progredido através do uso de estratégias de proteção em jardins botânicos e bancos de sementes, são necessárias novas abordagens para algumas das espécies mais ameaçadas. A complementação de estratégias de conservação *in situ* em combinação com *ex situ*, pode ser importante para a preservação da biodiversidade de espécies ameaçadas em muitos habitats.

A conservação *in situ* pode não ser suficiente para enfrentar os desafios de salvar espécies ameaçadas de extinção. Apesar de os bancos de sementes poderem ser utilizados para a conservação *ex situ* da maioria das espécies ameaçadas, há um número significativo de espécies para as quais os bancos de sementes não são uma opção adequada. Conservar a diversidade genética das espécies e das populações é muito importante nestas situações, sendo assim, a micropropagação pode proporcionar um grande número de propágulos de uma secção transversal da diversidade genética de uma região (ROGERS, 2003).

Entre as ferramentas *in vitro* de conservação *ex situ*, a propagação vegetativa e os métodos de aclimação podem contribuir para a produção de propágulos, tanto para criopreservação quanto para a translocação ou projetos de reintrodução (ASHMORE; HAMILTON; OFFORD, 2011). Além disso, as técnicas de cultivo *in vitro* vêm sendo utilizadas para estudar os hábitos de crescimento de plantas, bem como os fatores ecológicos que influenciam no seu crescimento e desenvolvimento (isto é, na “Ecologia” *in vitro*). Embora existam padronizações para os métodos de propagação *in vitro*, existem chances de determinadas espécies apresentarem necessidades de crescimento incomuns e, portanto, exigirem procedimentos específicos. Outro fator a se considerar é a quantidade limitada de material disponível de plantas de espécies raras, que traz grandes desafios na aplicação de métodos *in vitro* quando tais espécies se encontram ameaçadas de extinção (SARASAN et al., 2006).

É interessante ressaltar que muitas espécies tropicais apresentam sementes cuja viabilidade é perdida em baixa umidade e temperatura (sementes recalitrantes), o que impede que sejam armazenadas através de métodos convencionais (CHIN, 1996). Para tais espécies, a cultura de tecidos em médio prazo é uma possibilidade para a conservação *ex situ*, e pode fornecer tecidos para criopreservação e armazenamento por longo prazo. A cultura *in vitro* de médio prazo (1-5 anos) e a criopreservação para conservação por longo prazo (> 5 anos) estão

bem estabelecidas para algumas espécies (ASHMORE et al., 1997; REED et al., 2005; REED, 2008). Técnicas *in vitro* são uma boa opção de longo prazo para a criopreservação de embriões ou de tecidos vegetativos, uma alternativa preferível aos bancos de sementes, para as espécies arbóreas tropicais, cujas sementes são recalcitrantes (NORMAN; MAKEEN, 2008).

No primeiro Congresso Internacional de Conservação de Orquídeas (IOCC - International Orchid Conservation Congress) realizado em 2001 na Austrália, a comunidade científica concordou que, até 2010, 90% das espécies de orquídeas ameaçadas deveriam estar em segurança, sendo 50% desse total em coleções *ex situ* e em programas de recuperação (DIXON; PHILLIPS, 2007). Até onde se sabe, é improvável que tal meta tenha sido cumprida globalmente, embora algumas iniciativas tenham tido sucesso, como o Banco de Sementes de Orquídeas na Austrália (Orchid Seed Bank Challenge in Western Australia), que alcançou o armazenamento de sementes e a seleção de micorriza de três quartos das 408 espécies terrestres nativas do sudoeste da Austrália, um hotspot de biodiversidade (SWARTS; DIXON, 2009). Surgiu também o projeto OSSSU - Orchid Seed Stores for Sustainable Use, da Darwin Initiative, que ultrapassou a meta inicial em três anos, ao armazenar 240 espécies (SEATON; MARKS; PRITCHARD, 2010).

Há mais de 30 anos, na Conferência Mundial de Orquídeas (WOC) realizada em Miami em 1984, foi proposta para a comunidade científica que trabalha com orquídeas a construção de um banco de sementes, como um seguro contra possíveis perdas de espécies em seus habitats na natureza (FAY, 2010). No entanto, apesar dos trabalhos prévios de Knudson, que trinta anos antes indicavam a possibilidade de armazenamento de sementes secas de orquídea sob baixas temperaturas por até vinte anos (KNUDSON, 1954), havia necessidade de mais dados. Investigações detalhadas dos últimos vinte anos têm revelado que, embora as sementes de algumas espécies não tolerem a secagem e o armazenamento a frio, para um grupo considerável de espécies os benefícios dessas técnicas são semelhantes aos quantificados em colheitas de sementes. Assim, é provável que a grande maioria das espécies que pertencem à família Orchidaceae seja capaz de tolerar o armazenamento a seco, provavelmente durante muitas décadas, quando mantidas a -20 °C (SEATON; PRITCHARD, 2003).

Além disso, como as sementes de orquídeas apresentam tamanho (0,05-6mm) e massa (0,31-24µg) reduzidos (ROBERTS; DIXON, 2008), um grande

número delas pode ser facilmente armazenado em um pequeno volume, facilitando a formação dos bancos de sementes, dispensando a necessidade de grandes instalações. De fato, um freezer doméstico tem capacidade suficiente para armazenar as sementes representativas da flora de orquídeas de um país.

O projeto da Darwin Initiative, "Armazenamento de Sementes de Orquídea para Uso Sustentável" (OSSSU) foi financiado pelo Defra (Departamento do Governo Britânico para o Meio Ambiente, Alimentação e Assuntos Rurais). O objetivo da instituição (<http://darwin.defra.gov.uk/>) era financiar projetos conjuntos entre instituições do Reino Unido e parceiros situados em localidades ricas em recursos biológicos, que poderiam se beneficiar da ajuda financeira adicional do Reino Unido. O OSSSU Project uniu, por três anos, o Royal Botanic Gardens, o Departamento de Conservação de Sementes do Kew em Wakehurst Place e países parceiros localizados inicialmente na Ásia e América Latina. O objetivo foi estabelecer uma rede global de bancos de sementes de orquídeas, com foco inicial em países com alta biodiversidade de orquídeas (SEATON; PRITCHARD, 2008).

Iniciado em outubro de 2007, com um workshop em Chengdu para participantes da própria China, além de representantes da Índia, Indonésia, Filipinas, Cingapura, Tailândia e Vietnã, o OSSSU Project propôs no evento o intercâmbio de experiências, o desenvolvimento de protocolos comuns e as metas do projeto. A segunda oficina, realizada para participantes oriundos de *hotspots* da América Latina, reuniu em Quito participantes do próprio Equador além de Bolívia, Brasil, Chile, Colômbia, Costa Rica, Cuba e Guatemala. A rede regional se expandiu para incluir México, Panamá, República Dominicana e Peru, que participam como membros associados (SEATON; MARKS; PRITCHARD, 2010). A importância do OSSSU Project não está relacionada apenas ao armazenamento de sementes de orquídeas por longo prazo, mas também à geração de informação. As espécies são germinadas em, pelo menos, dois meios diferentes, sendo um deles o Knudson C (KNUDSON, 1946) e o outro, meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962). Esse procedimento gerou dados que permitiram a comparação do desempenho de, no mínimo, 240 espécies representativas de uma ampla gama de gêneros.

Algumas espécies germinam bem em meios diferentes como descrito por Cueva e González (2009) que relataram maior percentual germinação (90%) para *Cyrtorchilum loxense* cultivada em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) do que em Knudson C (60%). Em contrapartida, sementes de *Paphiopedilum delenatii*

apresentam maior porcentagem de germinação em meio Knudson C (90,1%) do que em meio MS (9%) (NHUT et al., 2005). Isso exemplifica como cada espécie está sendo germinada em pelo menos dois meios – não necessariamente MS – com base na experiência particular do país em germinação de sementes de orquídeas da flora local. O site do OSSSU Project (<http://osssu.org/>) disponibiliza informações sobre participantes e recursos, além de notícias atualizadas, através das quais os parceiros podem acessar informações sobre o material, o local e o modo de armazenamento e germinação. Os protocolos comuns (para detalhes ver SEATON; PRITCHARD, 2003; <http://osssu.org/main/resources.html>) permitem que sejam feitas comparações entre uma ampla variedade de espécies. Um elemento-chave para o sucesso do projeto é o estabelecimento de uma definição comum de germinação, que considera apenas sementes cheias – que contêm embriões viáveis – que atingem um ponto de intumescimento suficiente para que o protocormo rompa a testa.

Por fim, é também um objetivo do projeto armazenar um grande número de sementes de cada espécie, de modo a preservar ao menos uma parte da biodiversidade genética presente nas populações selvagens. É importante ressaltar ainda que a segurança de um banco de sementes pode ser bastante aumentada através do procedimento de duplicação, que deve, no entanto, ser realizado no âmbito dos atuais marcos legais, tanto no país como em acordo com regulamentos internacionais. Além do armazenamento da duplicata do banco no próprio país, existe a opção adicional de depositar acessos duplicados de sementes de orquídeas no Banco de Sementes do Milênio, localizado no Royal Botanic Gardens, Kew, Inglaterra (SEATON; PRITCHARD, 2011).

No Brasil a UNOESTE – Universidade do Oeste Paulista foi a pioneira em alinhar-se ao OSSSU – Project, sendo seguida depois pela UFPR – Universidade Federal do Paraná. Ambas instituições têm participado das discussões dos grupos de trabalhos que ocorrem no mundo inteiro. Em 2008 a Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE – iniciou o estabelecimento de um banco de sementes em parceria com o projeto "Armazenamento de Sementes de Orquídea para Uso Sustentável" – Orchid Seed Stores for Sustainable Use (OSSSU) – da Darwin Initiative. Atualmente o banco conta com 350 lotes de sementes provenientes de orquidários certificados, que realizam polinização cruzada entre os espécimes. As amostras pertencentes a 133 espécies diferentes estão estocadas a -18°C ; destas,

22 espécies estão indicadas em listas vermelhas e 58 pertencem ao gênero *Cattleya*. Periodicamente avalia-se a qualidade fisiológica das sementes armazenadas através do teste de tetrazólio e da germinação assimbiótica no meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), sendo as análises realizadas através de imagens digitalizadas. Tal procedimento auxilia na determinação das melhores estratégias de armazenamento para as sementes de orquídeas brasileiras.

1.3 Considerações Finais

A conservação *ex situ* de orquídeas através de bancos de sementes constitui uma ferramenta bastante econômica, por não necessitar de grandes espaços e investimentos. Entretanto, ainda faltam estudos para determinar o número de espécies tolerantes ao frio e dessecação. Dessa forma, para a conservação das espécies de orquídeas é necessário alinhar todas as formas de conservação *in situ* e *ex situ*, de modo a promover a preservação de sua diversidade.

REFERÊNCIAS

ASHMORE, S. E. (ed). Status report on the development and application of in vitro techniques for the conservation and use of plant genetic resources. Rome, Italy: International Plant Genetic Resources Institute, 1997. 67.

ASHMORE, S. E.; HAMILTON, K. N.; OFFORD, C. A. Conservation technologies for safeguarding and restoring threatened flora: case studies from Eastern Australia. **In Vitro Cellular Development Biology – Plant**, v. 47, p. 99-109. 2011.

BARBIERI, R. L. Conservação e uso de recursos genéticos vegetais. In: FREITAS, L.B.; BERED, F. (org.) **Genética e evolução vegetal**. Porto Alegre: Ed. UFRGS, 2003. p. 311-342.

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

CHIN H. (ed.). **Strategies for conservation of recalcitrant species**; Plant Biotechnology Laboratory, Faculty of Life Sciences, University of Kebangsaan Malaysia. Bangi, Selangor, Malaysia, 1996.

CUEVA A.; GONZÁLEZ, Y. In vitro germination and somatic embryogenesis induction in *Cyrtorchilum loxense*, an endemic and vulnerable orchid from Ecuador. p56–62. In: PRIDGEON, A.; SUAREZ, J.P. (eds). **Proceedings of the Second Scientific Conference on Andean Orchids**. 2009.

DIXON, K. W.; PHILLIPS, R.D. The orchid conservation challenge. **Lankesteriana**, v. 7, p. 11–12, 2007.

FAY, M. F.; CHASE, M. W. Orchid biology: from Linnaeus via Darwin to the 21st century. **Annals of Botany**, v. 104, n.1, p. 359–364, 2009.

FAY, M. F. Celebrating orchids in the International Year of Biodiversity. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.163, p. 107–110, 2010.

GSPC. **Global strategy for plant conservation**. 2010. Disponível em: <<http://www.plants2010.org/>>

IUCN. **The 1997 IUCN Red List of Threatened Plants**. Gland, Switzerland and Cambridge, UK.; Compiled by the World Conservation Monitoring Centre. International Union for the Conservation of Nature (IUCN), 1998.

IUCN. **The IUCN Red List of Threatened Species**. Version 2016-3. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org>>. Acesso em: 04 Sept. 2016.

KAUTH P.; KANE M. E.; VENDRAME W. A. Comparative *in vitro* germination ecology of *Calopogon tuberosus* var *tuberosus* (Orchidaceae) across its geographic range. **In Vitro Cellular Development Biology – Plant**, v. 47, p.148-156, 2011.

KNUDSON, L. A new nutrient solution for the germination of orchid seed. **American Orchid Society Bulletin**, v. 14, p. 214-217, 1946.

KNUDSON, L. Storage and viability of orchid seed. **American Orchid Society Bulletin**, v. 22, p. 260-261, 1954.

KOPOWITZ, H.; HAWKINS, B.A. Global climate change is confounding species conservation strategies. **Integrative Zoology**, v. 7, p. 158-164, 2012

MIRENDA, T.J. Botanic gardens, education and conservation Strategies: The need for a coordinated approach. **Lankesteriana**, v 11, n. 3, p. 301-305, 2011.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. Tissue culture – a new means of clonal propagation of orchids. **American Orchid Society Bulletin**, v. 33, p. 473-478, 1962.

NORMAH M. N.; MAKEEN A. M. Cryopreservation of excised embryos and embryonic axes. In: REED, B. (ed.). **Plant cryopreservation: a practical guide**. Springer, NY, 2008. p 211–240.

NHUT, D. T. et al. A wounding method and liquid culture in *Paphiopedilum delatanii* propagation. **Propagation of Ornamental Plants**, v. 5, p. 158–163, 2005.

PRIMACK, R.B.; RODRIGUES, E. **Biologia da conservação**. Londrina: Planta, 2001. 328p.

REED, B. M. et al. **Technical guidelines for the management of field and in vitro germplasm collections**. Rome, Italy; International Plant Genetic Resources Institute/Food Agriculture Organization/System-wide Genetic Resources Programme, 2005.

REED, B. M. (ed). **Plant cryopreservation: a practical guide**. Springer, NY, 2008. 513p.

REED, B. M. et al. Biodiversity conservation and conservation biotechnology tools. **In Vitro Cellular Development Biology – Plant**, v. 47, p. 1-4, 2011.

ROGERS S. Tissue culture and wetland establishment of the freshwater monocots *Carex*, *Juncus*, *Scirpus*, and *Typha*. **In Vitro Cellular Development Biology – Plant**, v. 39, p. 1-5, 2003.

ROBERTS, D. L.; DIXON, K.W. Orchids. **Current Biology**, v. 18, p. 325–329, 2008.

SARASAN, V. et al. Conservation in vitro of threatened plants progress in the past decade. **In Vitro Cellular Development Biology – Plant**, v. 42, n. 3, p. 206–214, 2006.

SEATON, P. T.; PRITCHARD, H.W. Orchid germplasm collection, storage and exchange. p.227–258. In: DIXON, K. W. et al. (eds.). **Orchid conservation**. Kota Kinabalu, Sabah: Natural History Publications, 2003.

SEATON, P. T.; PRITCHARD, H.W. Life in the Freezer: Orchid seed banking for the future. **Orchids**, v. 77, p. 762–773, 2008.

SEATON, P.; MARKS, T.; PRITCHARD, H.W. Final report: **Orchid Seed Stores for Sustainable Use (OSSU)**. 2010. Disponível em: <<http://www.darwininitiative.org.uk/documents/16012/21706/16-012%20FR%20-%20edited.pdf>> Acesso em: 10 dez. 2015.

SEATON, P.T. et al. Ex situ conservation of orchids in a warming world. **Botanical Review**, v. 76, p. 193–203, 2010.

SEATON, P.T.; PRITCHARD, H.W. Orchid seed for sustainable use: a model for future seed banking activities. **Lankesteriana**, v. 11, n. 3, p. 349-353, 2011.

SWARTS N. D.; DIXON K. W. Terrestrial orchid conservation in the age of extinction. **Annals of Botany – London**, v. 104, p. 543–556; 2009.

UNDP. **Development Goal 7.** 2010a. Disponível em: <<http://www.un.org/en/mdg/summit2010/>> (pdf/ mdg%20outcome%20document.pdf).

UNDP. **Millennium Development Goals.** 2010b. Disponível em: <<http://www.undp.org/mdg/>>

2. CAPÍTULO II: CONDIÇÕES DO TESTE DE TETRAZÓLIO NA AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE SEMENTES DE ORQUÍDEAS

RESUMO - O teste de tetrazólio é um dos mais tradicionais para a avaliação da qualidade e vigor das sementes. A realização de pré-condicionamento tem melhorado a eficácia do referido teste. No presente trabalho avaliou-se a eficiência de diferentes pré-condicionamentos, a influência do pH, das concentrações e dos tempos de exposição à solução de tetrazólio na avaliação da qualidade de amostras de sementes de orquídeas. Para analisar o uso do pré-condicionamento, duas amostras de sementes foram submetidas a diferentes tratamentos: em água, em solução de sacarose 10% e em solução de glicose a 10%, à temperatura ambiente por 24 horas. Após, as sementes foram imersas em diferentes soluções de tetrazólio, diluído em tampão ou água por três períodos, em banho-maria a 40 °C, no escuro. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado e a comparação das médias foi feita pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. O teste de tetrazólio em sementes pré-condicionadas em solução de glicose ou de sacarose a 10% mostrou-se mais eficaz. O uso de solução tampão na diluição do sal de tetrazólio não apresentou diferença em relação à diluição em água. Sementes mantidas por 24 horas em contato com a solução de tetrazólio a 1% apresentaram maiores valores de viabilidade para as duas amostras de sementes.

Palavras chave: Orchidaceae. Pré-condicionamento. Solução tampão.

Tetrazolium test conditions in the evaluation of orchid seeds viability

ABSTRACT - Tetrazolium test is one of the most traditional for the evaluation of seeds quality and vigor. Optional preconditioning procedures have improved the efficiency of this test. This work evaluated the efficiency of different preconditioning procedures, the influence of pH, concentrations and exposure time to tetrazolium solution in assessing the quality of lots of orchid seeds. The analysis was made through magnification of digital images. For the evaluation of preconditioning, two seed lots were aliquoted and submitted to different treatments: sucrose 10% solution, glucose 10% solution and water, at room temperature, for 24 hours. After that, seeds were immersed in different tetrazolium solutions prepared with buffer and water for three distinct periods, in a water bath at 40 °C, in the dark. The design was completely randomized and the average comparison was made by Tukey test at 5% probability. The tetrazolium test in orchid seeds preconditioned in glucose 10% solution and in sucrose 10% solution was more effective. The use of buffer for tetrazolium, salt dilution showed no difference with regard to dilution with water. Seeds kept for 24 hours in contact with tetrazolium 1% solution showed higher viability values for both seed lots.

Key words: Orchidaceae. Preconditioning. Buffer solution.

2.1 Introdução

As orquídeas (Família Orchidaceae) representam o segundo maior grupo de plantas entre as Angiospermas, com mais de 26.000 espécies distribuídas em cerca de 736 gêneros (CHASE et al., 2015). Presentes em todos os continentes – exceto Antártida – e particularmente numerosas e diversificadas, como epífitas nos trópicos úmidos, as orquídeas há muito fascinam os pesquisadores por suas notáveis estratégias de sobrevivência, morfologia floral e vegetativa e síndromes de polinização (FAY; CHASE, 2009).

Ainda assim, as orquídeas enfrentam um futuro incerto devido à existência de um número cada vez maior de colecionadores sem escrúpulos, aos impactos da mudança do clima e à perda de seus habitats (SWARTS; DIXON, 2009). Apesar de a conservação de plantas estar progredindo através do uso de estratégias de proteção *in situ* e *ex situ* em jardins botânicos e bancos de sementes, são necessárias novas abordagens para algumas das espécies mais ameaçadas. Estratégias de conservação de sementes *ex situ*, como armazenamento *in vitro* e criopreservação podem complementar as estratégias *in situ* e garantir a preservação da biodiversidade de espécies cujos habitats são muito ameaçados (REED et al., 2011).

O estabelecimento de um banco genético através do armazenamento de sementes é de extrema importância, tanto para espécies silvestres que carregam características próprias, quanto para espécies já melhoradas (YAM; ARDITTI; CAMERON, 2009).

Para testar a viabilidade de sementes a serem armazenadas em bancos, ou daquelas já armazenadas por um período, devem ser realizados testes de viabilidade dos lotes. Para tanto, uma das possibilidades é o teste de germinação, que consiste em determinar o potencial germinativo das sementes (CARVALHO; NAKAGAWA, 2012). No entanto, tal procedimento apresenta limitações quanto à diferenciação de lotes e ao tempo necessário para a obtenção dos resultados (CUSTÓDIO, 2005). Particularmente para orquídeas, o teste de germinação demanda técnicas especializadas e custo elevado de implementação, pois suas sementes necessitam estabelecer uma relação com fungos micorrízicos e/ou a utilização de meios de cultura adequados para germinar (ALVAREZ-PARDO; FERREIRA, 2006). O tempo necessário para obter a germinação simbiótica pode

variar entre um e alguns meses, ou mesmo um ano, dependendo da espécie e do lote de sementes (RASMUSSEN, 2011), bem como da capacidade de um determinado fungo isolado de induzir a germinação (BERTOLINI; DAMON; VELÁQUEZ, 2001).

A utilização de testes rápidos para avaliar a viabilidade das sementes é importante, principalmente, para agilizar decisões quanto ao manejo de lotes durante as etapas de pós-colheita. Os testes, que demandam curto período de tempo, fundamentam-se nos eventos iniciais da deterioração, baseando-se na integridade das membranas celulares e na redução das atividades enzimáticas e respiratórias das sementes, como o teste de tetrazólio (MARCOS-FILHO, 2015). Esse teste tem se mostrado uma alternativa interessante pela qualidade e rapidez na determinação da viabilidade e do vigor da semente, permitindo obter resultados, de modo geral, em menos de 24 horas (DIAS; ALVES, 2008).

Em culturas comerciais, como a soja, além de possibilitar a avaliação da viabilidade e do vigor dos lotes de sementes, o teste de tetrazólio fornece dados sobre as possíveis causas responsáveis pela redução de sua qualidade: danos mecânicos, deterioração por umidade e danos causados por percevejos, que são os problemas que mais comumente afetam a qualidade fisiológica das sementes. Além desses, os danos de secagem, estresses hídricos e geadas também podem ser facilmente identificados através de sua utilização. A possibilidade de um amplo diagnóstico tem sido a grande responsável pelo elevado índice de adoção do teste no Brasil, pois, além de apontar os problemas de redução de qualidade das sementes, o teste, quando aplicado nas diversas etapas do sistema de produção, pode identificar os pontos de origem desses problemas, permitindo que ações corretivas sejam adotadas, resultando na produção de sementes de alta qualidade (FRANÇA NETO, 1998).

O funcionamento do teste de tetrazólio baseia-se na detecção da atividade das enzimas desidrogenases, particularmente da desidrogenase do ácido málico, que reduz o sal 2,3,5 trifenil cloreto de tetrazólio nos tecidos vivos da semente, os quais transferem íons de hidrogênio para o referido sal (MARCOS-FILHO, 2015). Quando a semente é imersa na solução de tetrazólio, esta se difunde através dos tecidos, ocorrendo nas células vivas a reação de redução, o que resulta na formação de um composto vermelho, não difusível, conhecido como trifetilformazan. Tal coloração indica a ocorrência de atividade respiratória nas

mitocôndrias e, conseqüentemente, a viabilidade do tecido. Tecidos mortos (não viáveis) não reagem com a solução, conservando sua cor natural (LAZAROTTO et al., 2011).

Para a realização do teste de tetrazólio são indicados procedimentos, chamados de pré-condicionamento, que visam facilitar a penetração da solução nos tecidos de interesse a serem avaliados. Em sementes de espécies florestais, diversos tratamentos de pré-condicionamento vêm sendo utilizados, como corte, escarificação e embebição em água (OLIVEIRA; CARVALHO; DAVIDE, 2001; MENDONÇA; COELHO; LUCHESE, 2006).

A utilização de solução de pré-tratamento de sacarose a 10% aumenta a precisão do teste de viabilidade. A comparação entre os resultados do teste de tetrazólio e aqueles obtidos nos testes de germinação *in vitro* de sementes de várias espécies do gênero *Cattleya* (HOSOMI et al., 2011), *Dactylorhiza* e *Vanda* (CUSTÓDIO et al., 2016) mostrou que há um aumento na correlação dos resultados graças à realização de procedimentos de pré-condicionamento. Resultados semelhantes utilizando o pré condicionamento em solução de sacarose também foram descritos para as orquídeas *Aerides maculosum* (DEEPTI; GAYATRI; SITIKANTHA, 2013) e *Aerides ringens* (DEEPTI; GAYATRI; SITIKANTHA, 2015).

No trabalho de Custódio et al. (2016), o uso de vácuo aumentou o processo de infiltração da solução de tetrazólio nas sementes de orquídeas de *Dactylorhiza fuchsii*, que apresenta carapaças duras; o mesmo trabalho relata a utilização de hipoclorito de sódio para a clarificação do tegumentos de sementes escuras de *Vanda curvifolia*, possibilitando melhor visualização da coloração do tetrazólio. Para Salazar-Mercado (2012) o uso de hipoclorito de sódio 1,0% foi importante para escarificar o tegumento de *Cattleya mendelli* permitindo a penetração do sal de tetrazólio, assim como para as espécies *Thelymitra pauciflora* e *Prasophyllum pruinosum* (DOWLING; JUSAITIS, 2012).

A alta acidez da solução de tetrazólio pode ser uma causa importante de variações obtidas nos testes. Idealmente, o pH destas soluções deve situar-se na faixa entre 6 e 8, o que depende fundamentalmente da qualidade da água utilizada no seu preparo. Frequentemente, entretanto, soluções preparadas apenas com água destilada são ácidas, isto é, apresentam pH inferior ao recomendado. Em consequência, a coloração dos embriões ocorre de forma inadequada, causando interpretações errôneas do estado de viabilidade das sementes. Este problema pode

ser evitado mediante o uso de uma "solução tampão de fosfato" no preparo do tetrazólio, que assegura a manutenção do pH dentro da faixa aceitável (DÜBBERN DE SOUZA, 1994; SALAZAR-MERCADO, 2012).

Desta forma além do pré-condicionamento, são parâmetros fundamentais para a obtenção de resultados confiáveis sobre a qualidade das sementes: a concentração da solução de tetrazólio, o tempo de exposição ao teste, o pH da solução e avaliação adequada da coloração das sementes.

2.2 Objetivos

O presente trabalho objetivou avaliar a eficiência de diferentes métodos de pré-condicionamento, a influência do pH da solução, concentrações e tempos de exposição à solução de tetrazólio na avaliação da viabilidade de lotes de sementes de orquídeas.

2.3 Material e Métodos

Frutos de *Cattleya tigrina* e *Cattleya labiata* foram coletados no Orquidário Aurora, localizado no município de Taciba – SP nos dias 06/06/2009 e 23/05/2010, respectivamente. Após a coleta, os frutos foram colocados em envelope de papel e mantidos em temperatura ambiente até a deiscência. Após a deiscência, as sementes foram limpas e armazenadas em envelope de papel sobre sílica gel a 4 °C, até atingir 6,5% de umidade (BRASIL, 2009). Uma alíquota de sementes de cada amostra foi então submetida aos testes de viabilidade, permanecendo as demais armazenadas em freezer a -18 °C, acondicionadas em microtubos mantidos em frascos de vidro hermeticamente fechados contendo sílica gel.

O teste de germinação foi realizado em meio MS adicionado sacarose (20g.L⁻¹) e ágar (6g.L⁻¹). O pH foi corrigido com NaOH para 5,6 e o meio de cultura autoclavado para posterior distribuição em placas de Petri de 60mm. Previamente à semeadura, 20 mg de cada lote de sementes foram desinfetadas por 10 minutos com DCCA – Dicloroisocianurato de sódio (5g.L⁻¹), acrescido de duas gotas por litro de Tween 80, dentro de seringas em câmara de fluxo laminar (MACHADO NETO; CUSTÓDIO, 2005). Após esse procedimento, as sementes foram lavadas duas vezes com água destilada autoclavada e em seguida 1,0 mL das soluções de sementes foram gotejadas dentro de cada placa de Petri. Em seguida as placas foram envoltas com filme plástico e transferidas para sala de crescimento à temperatura de 25±3 °C com fotoperíodo de 16 horas por aproximadamente 50 dias.

Para a contagem da germinação das sementes foram marcados três campos em cada placa, os quais foram fotografados com câmera digital Sony DSC-P10 acoplada manualmente na lente ocular do microscópio estereoscópio. Todos os campos das placas foram fotografados a cada sete dias, mantidos sempre na mesma posição. As imagens foram analisadas no computador e modificadas, quando necessário, com o uso do software Adobe Photoshop® CC 2015, através de ferramentas de ampliação de imagem, definição de contraste e brilho. As sementes que apresentaram embriões expandidos e massa celular de coloração verde (estágio 1) foram consideradas germinadas, segundo as definições de Seaton e Hailes (1989). Foram utilizadas três placas de Petri para semear cada um dos lotes de sementes, marcando-se três campos de contagem em cada placa.

A viabilidade das sementes de orquídea, verificada pelo teste de tetrazólio e taxa germinação, foi expressa em porcentagem.

Foi utilizado um lote de *Cattleya tigrina* e outro de *Cattleya labiata* para a realização dos testes de tetrazólio, conduzidos das seguintes formas: (i) amostras sem pré-condicionamento, (ii) amostras com pré-condicionamento em solução de sacarose a 10%, (iii) amostras com pré-condicionamento em solução de glicose a 10% e (iv) amostras com pré-condicionamento em água; três períodos de exposição das sementes à solução de tetrazólio (3, 12 e 24 horas), em três concentrações de sais de tetrazólio (0,1; 0,5 e 1,0%) e em duas diluições dos sais de tetrazólio, em água e em solução tampão fosfato. A solução tampão foi preparada conforme Dübbern de Souza (1994).

Foram pesadas em média 20 mg de cada amostra de sementes (*C. tigrina* e *C. labiata*) em balança de precisão 0,00001g. As sementes foram imediatamente transferidas para microtubos de 1,5mL e submetidas aos diferentes pré-condicionamentos.

O pré-condicionamento das sementes foi realizado adicionando-se 1,5mL de água ou 1,5mL da solução de sacarose a 10% ou 1,5mL de solução de glicose a 10% nos microtubos por 24 horas a temperatura ambiente. Após este período, as soluções foram retiradas com auxílio de uma pipeta Pasteur e as sementes foram lavadas duas vezes com água destilada. Foram adicionados 1,5mL das soluções de tetrazólio nas diferentes concentrações e os microtubos foram acondicionados em banho-maria, no escuro, a 40 °C pelos tempos determinados.

A avaliação da viabilidade das sementes foi baseada na captura e ampliação de imagens digitalizadas. Após o período de incubação de cada amostra, descartou-se 1,0mL da solução de tetrazólio e o restante foi gotejado em cima de uma lâmina de vidro, tendo sido as imagens capturadas em scanner de mesa HP Scanjet G2710 com resolução de 3200 dpi. As contagens das sementes foram realizadas na tela do computador e modificadas, quando necessário, com o uso de software de imagens comum através de ferramentas de ampliação de imagem e tratamento de contraste e brilho. Foram consideradas viáveis as sementes portadoras de embriões coloridos de vermelho.

A viabilidade das sementes das orquídeas foi expressa em porcentagem, o delineamento utilizado foi inteiramente casualizado e a comparação

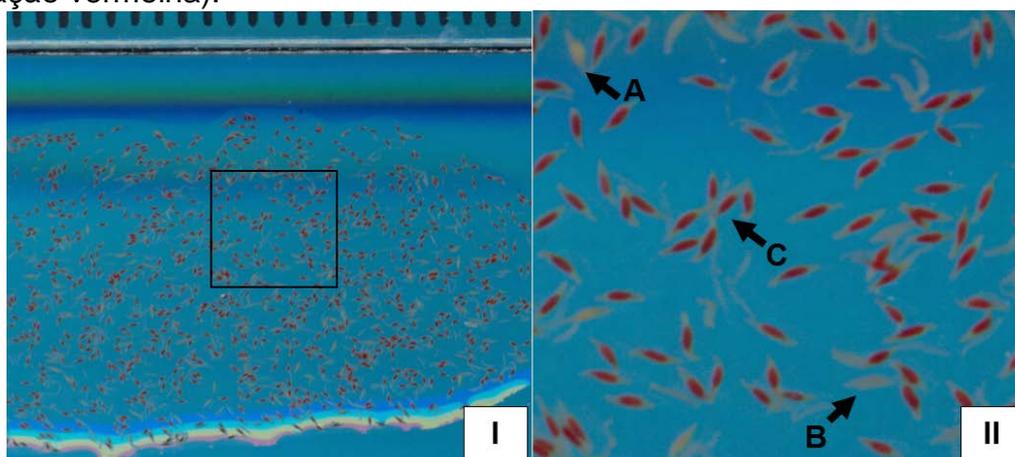
das médias foi feita pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. A análise dos dados foi realizada pelo programa SISVAR® (FERREIRA, 2014).

2.4 Resultados e Discussão

As amostras das sementes de orquídeas *Cattleya tigrina* foram coletadas em junho de 2009 e as amostras das sementes de orquídeas *Cattleya labiata* foram coletadas em maio de 2010. Elas foram estocadas por 24 e 13 meses, respectivamente, a 6% de teor de água, à -18 °C.

A visualização detalhada das sementes de orquídeas depende da utilização de instrumentos de ampliação, dado seu tamanho reduzido. Uma vez que os instrumentos para esse fim são caros e de difícil acesso para orquidários e laboratórios de pequeno porte, a alternativa encontrada foi a digitalização das imagens das sementes utilizadas nos testes de tetrazólio (Figura 2.1), conforme Hosomi et al. (2011). Sementes com coloração vermelha foram consideradas viáveis e sementes brancas foram consideradas mortas. O uso de imagens digitalizadas permite a documentação da imagem em arquivos digitais e a interpretação simultânea por mais de um analista e laboratórios localizados em diferentes locais do mundo (CUSTÓDIO; DAMASCENO; MACHADO-NETO, 2012).

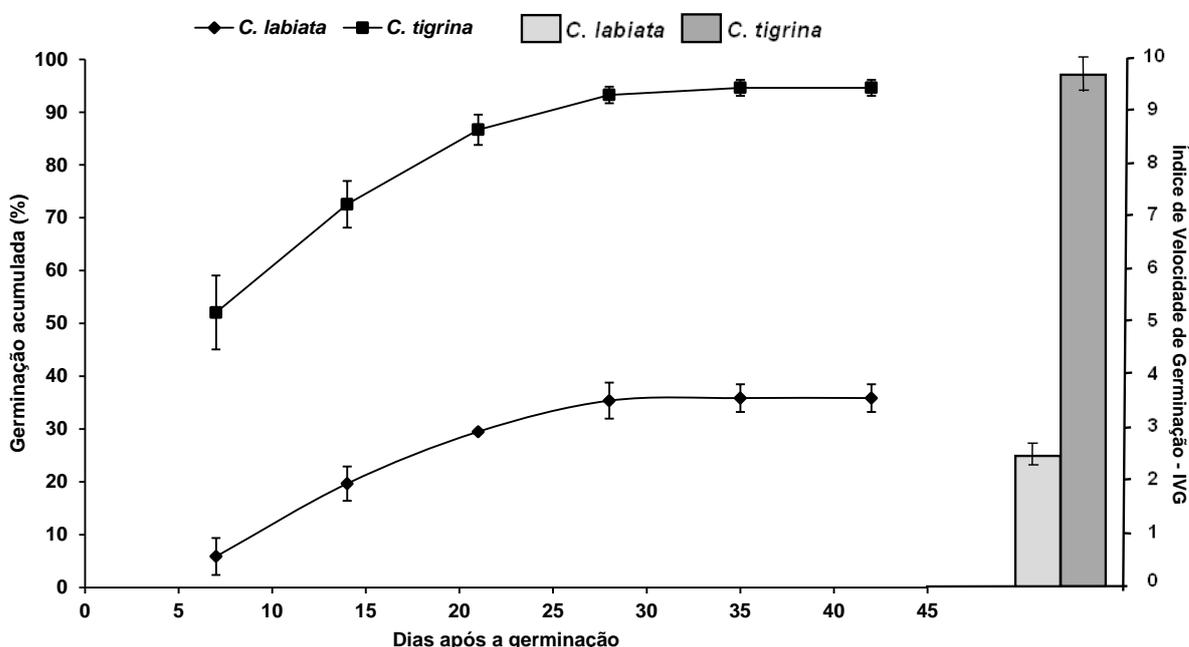
FIGURA 2.1 - Sementes de *Cattleya tigrina* pré-condicionadas em solução de sacarose, submetidas ao teste de tetrazólio a 1%, tamponadas, pelo período de 24 horas. I – Imagem digitalizada da lâmina, com referência da escala da régua em milímetros; II – Campo ampliado da imagem da lâmina onde: A- sementes não viáveis (coloração branca), B- palha (sementes sem embrião) e C- sementes viáveis (coloração vermelha).



As sementes de *Cattleya tigrina* apresentaram germinação acumulada de 94,6% com IVG de $9,75 \pm 0,65$, enquanto *Cattleya labiata* apresentou 35,9% de germinação com IVG de $2,51 \pm 0,41$ (Figura 2.2). Os dados mostram que as

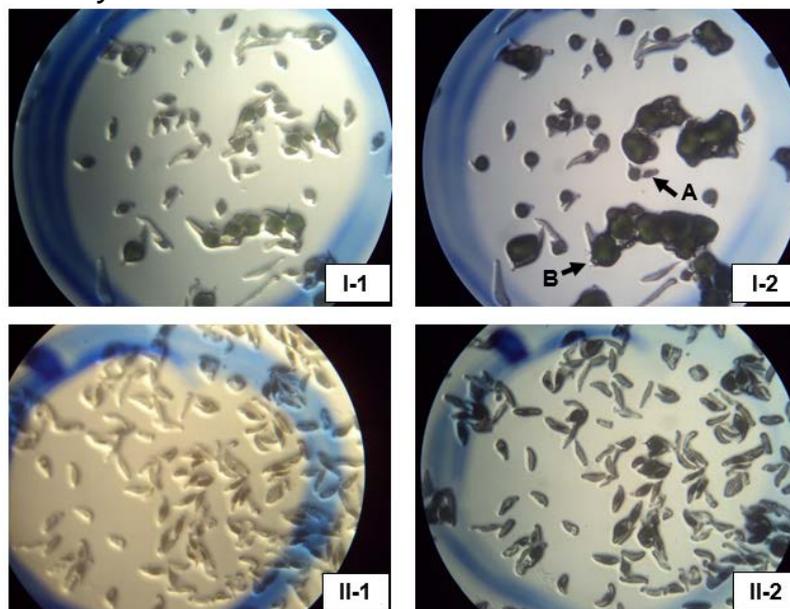
sementes de *C. labiata* estavam com baixo vigor. Na Figura 2.3 é possível observar que as sementes de *C. labiata* demoraram mais para germinar e que, ao sétimo dia, muitas sementes não haviam germinado, estando seus protocormos pouco desenvolvidos em comparação a *C. tigrina*, os quais já se apresentavam bem desenvolvidos na terceira semana, alguns deles apresentando rizoides como destacado na Figura 2.3.

FIGURA 2.2 - Germinação assimbiótica acumulada (%) e IVG – Índice de Velocidade de Germinação das amostras de sementes de *Cattleya labiata* e *Cattleya tigrina* semeadas em meio MS.



Em relação à necessidade de pré-condicionamento, para as sementes de *C. labiata* e *C. tigrina*, o uso de solução de glicose 10% ou sacarose 10% forneceu os melhores resultados para o teste de tetrazólio, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos. Em *C. tigrina*, a ausência de pré-condicionamento apresentou o resultado mais baixo de viabilidade. Em *C. labiata*, que apresentou baixo vigor, o uso de água e a ausência de pré-condicionamento não diferiram estatisticamente (Tabela 2.1).

FIGURA 2.3 - Germinação assimbiótica de sementes de orquídeas da espécie *Cattleya tigrina* e *Cattleya labiata* em meio MS por 42 dias. I-1- fotografia ao sétimo dia após a semeadura de *Cattleya tigrina*; I-2 fotografia ao vigésimo primeiro dia após a semeadura de *Cattleya tigrina* onde A- Semente não germinada; B- protocormo com rizóides em desenvolvimento. II-1- fotografia ao sétimo dia após a semeadura de *Cattleya labiata*; II-2 fotografia ao vigésimo primeiro dia após a semeadura de *Cattleya labiata*.



De acordo com a Tabela 2.1, que compara o uso de solução tampão fosfato na diluição dos sais de tetrazólio ao uso de água destilada, não houve diferenças significativas em todos os tratamentos de pré-condicionamento. Foram observadas diferenças entre os pré-condicionamentos utilizando as mesmas formas de diluição do sal de tetrazólio. As sementes sem pré- condicionamento tiveram os valores mais baixos de viabilidade, e o uso de solução de glicose 10% e solução de sacarose 10% apresentaram os maiores valores. Segundo Dübbern de Souza (1994), o uso da solução tampão seria necessário para manter o pH na faixa ótima para o teste que está entre 6,0 a 8,0, uma vez que o uso de água ácidas pode causar interpretações errôneas sobre o estado de viabilidade das sementes. Para Macedo et al. (2014), a utilização de uma solução tamponada de tetrazólio a 0,5% foi melhor para avaliar a viabilidade de *Brassavola tuberculata*. De acordo com Soares et al. (2014), o uso de solução a 0,5% de tetrazólio diluído em tampão foi melhor para a avaliação de *Cattleya labiata* (*autumnalis* x f. *alba*), tendo sido a utilização de solução aquosa a 0,125% a melhor para as espécies *Brassavola*

tuberculata, *Cattleya labiata* f. *Amoema* e *Dendrobium antenatum*, no entanto, neste trabalho as sementes ficaram imersas sob temperatura ambiente (25 ± 2 °C).

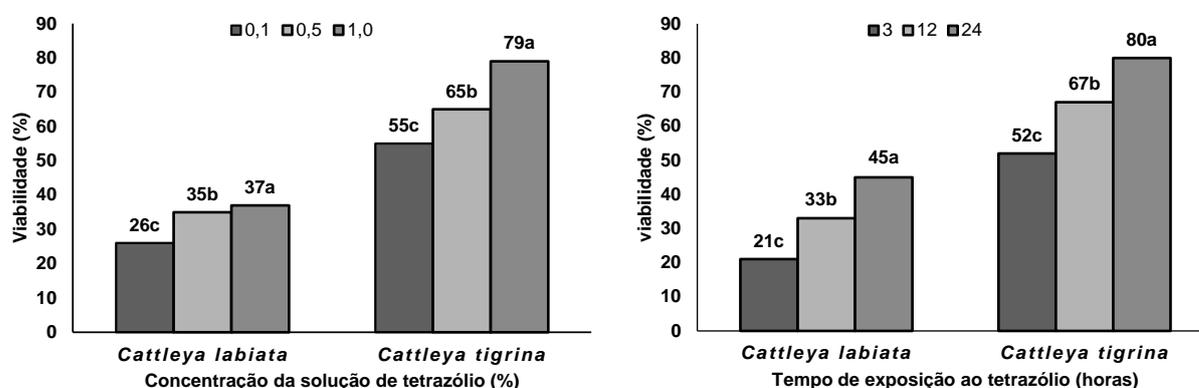
TABELA 2.1 - Viabilidade de sementes (%) de *Cattleya labiata* e *Cattleya tigrina*, em resposta a diferentes pré-condicionamentos e ao uso de solução tampão.

Pré - Condicionamento	Viabilidade (%)			
	<i>Cattleya labiata</i>		<i>Cattleya tigrina</i>	
	Sem tampão	Com tampão	Sem tampão	Com tampão
Controle	29 ^{Ba}	27 ^{Ba}	45 ^{Ca}	46 ^{Ca}
Água	30 ^{Ba}	30 ^{Ba}	70 ^{Ba}	67 ^{Ba}
Glicose	38 ^{Aa}	35 ^{Aa}	76 ^{Aa}	75 ^{Aa}
Sacarose	38 ^{Aa}	36 ^{Aa}	77 ^{Aa}	74 ^{Aa}

Médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem entre si verticalmente e letras minúsculas não diferem entre si horizontalmente dentro de cada espécie, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

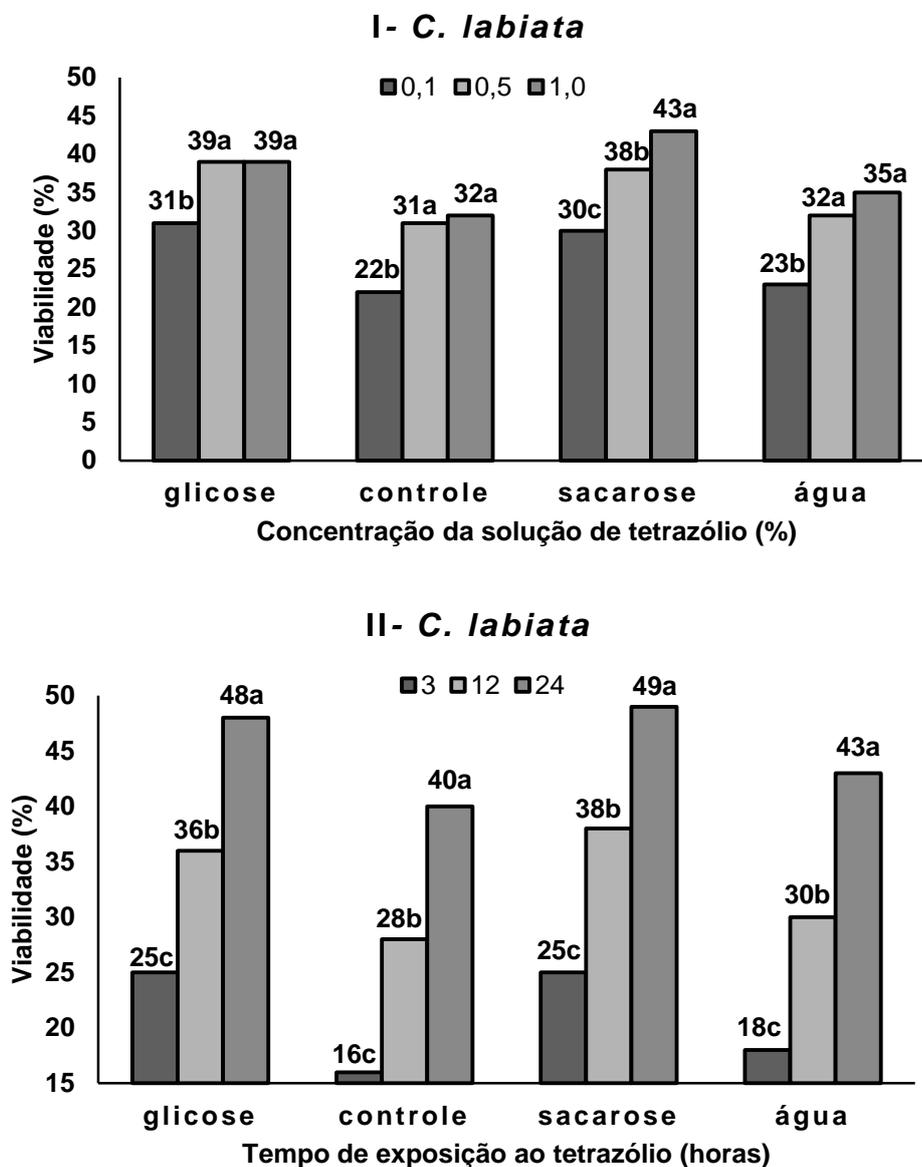
Na determinação da melhor concentração da solução de tetrazólio foi possível verificar que quanto maior a concentração do sal, maior a viabilidade das sementes (Figura 2.4). A concentração de 1,0 % de sal de tetrazólio apresentou os maiores valores de viabilidade, 79% para *C. tigrina* e 37% para *C. labiata*. Esses dados corroboram o trabalho de Hosomi et al. (2011), que também indica essa concentração como a melhor. Em relação ao tempo de exposição das sementes à solução de tetrazólio, foi possível perceber que o tempo de 24 horas proporcionou os melhores valores de viabilidade para as duas espécies analisadas – 80% de viabilidade para *C. tigrina* e 45% de viabilidade para *C. labiata* – resultados significativos em relação a outros intervalos de tempo (Figura 2.4).

FIGURA 2.4 - Viabilidade de sementes (%) de *Cattleya labiata* e *Cattleya tigrina*, submetidas a diferentes concentrações da solução de tetrazólio e diferentes tempos de exposição. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si na mesma amostra de sementes, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.



Na interação pré-condicionamento e concentração da solução de tetrazólio para as sementes de *C. labiata*, foi possível verificar que, quanto maior a concentração, maior a viabilidade (Figura 2.5-I), sendo que em solução de sacarose 10% o uso de tetrazólio 1,0% apresentou diferenças significativas comparadas com solução 0,5%. Para as outras condições de pré-condicionamento não houve diferenças estatísticas entre as concentrações de 1,0% e 0,5%. O uso de solução de tetrazólio 0,1% apresentou os valores mais baixos. Já em relação ao tempo de exposição das sementes à solução de tetrazólio, o período de 24 horas apresentou os valores mais significativos de viabilidade para todos os tratamentos de pré-condicionamento, seguido do período de 12 horas (Figura 2.5-II).

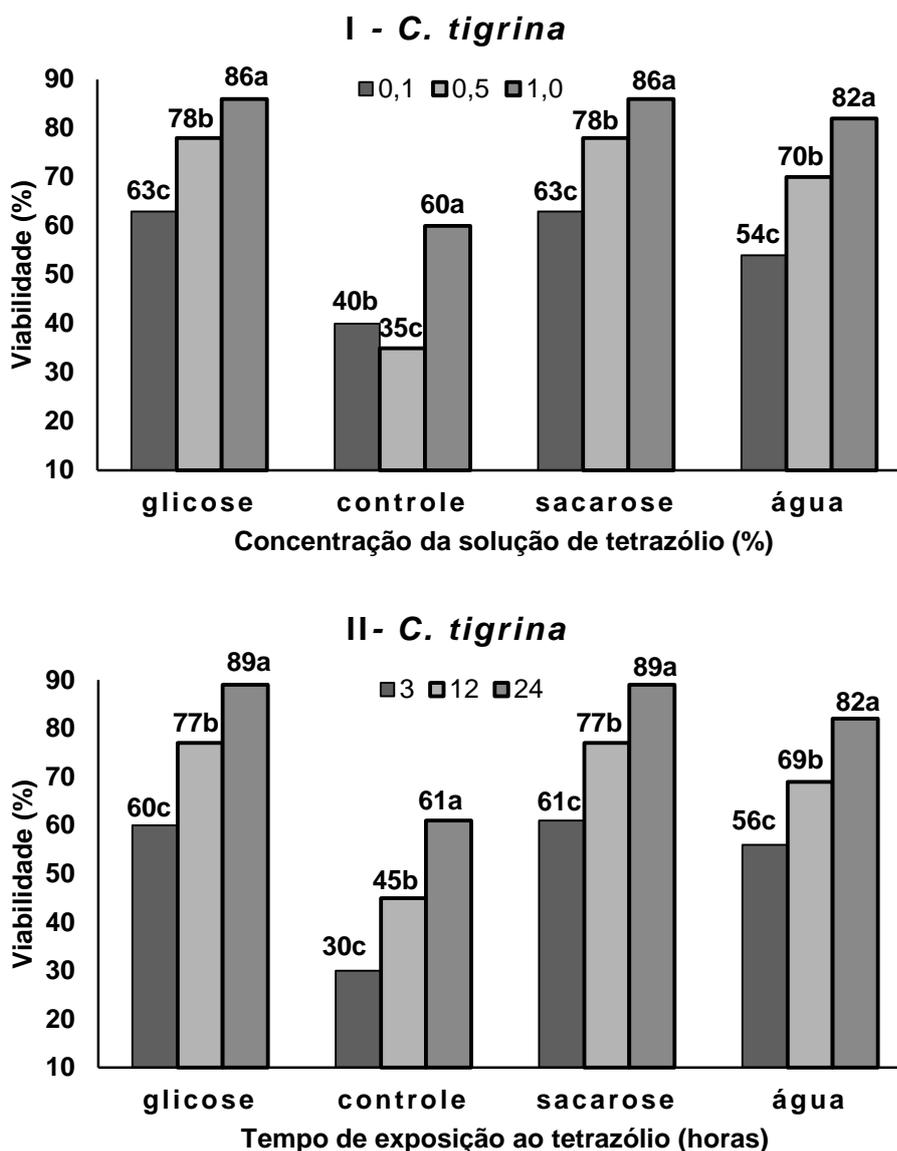
FIGURA 2.5 - Viabilidade de sementes (%) de *Cattleya labiata*, submetidas a quatro condições de pré-condicionamento; I- viabilidade das sementes em diferentes concentrações da solução de tetrazólio; II- viabilidade das sementes em diferentes tempos de exposição a solução de tetrazólio. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si no mesmo tratamento de pré-condicionamento, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.



Para as sementes de *C. tigrina*, a análise da interação pré-condicionamento e concentração da solução de tetrazólio permitiu verificar o mesmo comportamento para o uso de água, solução de glicose 10% e solução de sacarose 10%, cujas concentrações 1,0% foram estatisticamente melhores, seguidas da concentração de 0,5%. Já para o controle do pré-condicionamento, os valores de viabilidade foram os menores, sendo a concentração de 0,1% melhor que o uso de 0,5% (Figura 2.6-I).

Na Figura 2.6-II observa-se o resultado da interação tipo de pré condicionamento e tempo de exposição das sementes à solução de tetrazólio. O uso de soluções de sacarose e glicose 10% apresentou resultados bem semelhantes, tendo apresentado maiores valores de viabilidade o período de 24 horas, seguidos de 12 horas. O controle permitiu verificar que, assim como *C. labiata*, *C. tigrina* apresentou os valores mais baixos de viabilidade, sendo que para 24 horas os valores foram maiores.

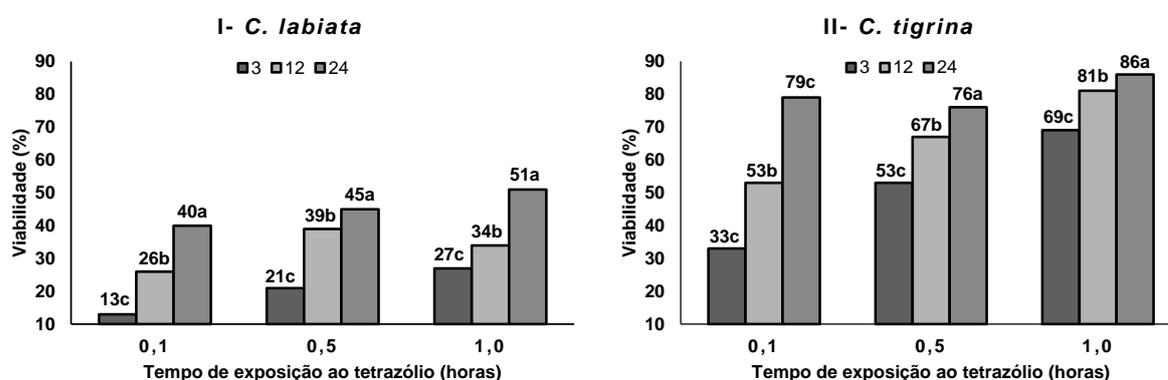
FIGURA 2.6 - Viabilidade de sementes (%) de *Cattleya tigrina*, submetidas a 4 condições de pré-condicionamento; I- viabilidade das sementes em diferentes concentrações da solução de tetrazólio; II- viabilidade das sementes em diferentes tempos de exposição a solução de tetrazólio. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si no mesmo tratamento de pré-condicionamento, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.



Na interação entre a concentração dos sais de tetrazólio e o tempo de exposição das sementes de *C. labiata* à solução de tetrazólio (Figura 2.7-I), quanto maior o tempo de exposição, maiores os valores de viabilidade das sementes em relação à concentração da solução de tetrazólio. Para os valores de 0,1%, 0,5% e 1,0%, o tempo de 24 horas apresentou valores mais significativos (Figura 2.7-I).

Já para *C. tigrina* (Figura 2.7-II), as concentrações 0,1%, 0,5% e 1,0% apresentaram resultados semelhantes, tendo o tempo de 3 horas apresentado os valores mais baixos de viabilidade, seguido pelo de 12 horas e depois de 24 horas, o qual forneceu os melhores resultados estatísticos. Os resultados para as sementes que foram mantidas em solução de tetrazólio a 0,1% em 24 horas foram maiores que os obtidos com uso de solução a 0,5 %. Nesse intervalo de tempo a elevação dos valores foi mais expressiva que em outros tratamentos. Sementes de triticale (*x.Triticosecale Wittmack*) – um híbrido resultante do cruzamento do trigo (*Triticum aestivum*) e centeio (*Secale cereale*) – mantidas em solução de tetrazólio 1,0% por 18 horas, a 40° C e embebidas entre papéis, também mostraram melhores resultados em comparação a concentrações inferiores de sais de tetrazólio (SOUZA et al., 2010).

FIGURA 2.7 - Viabilidade de sementes (%) de *Cattleya labiata* (I) e *Cattleya tigrina* (II), submetidas a diferentes concentrações da solução de tetrazólio e em diferentes tempos de exposição a solução de tetrazólio. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si na mesma concentração de solução de tetrazólio, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.



Para Soares et al. (2014), o uso de concentrações elevadas do sal de tetrazólio somado ao tamanho diminuto das sementes, além de suas características morfológicas, pode proporcionar resposta reversa ao teste, ou seja, ao invés da

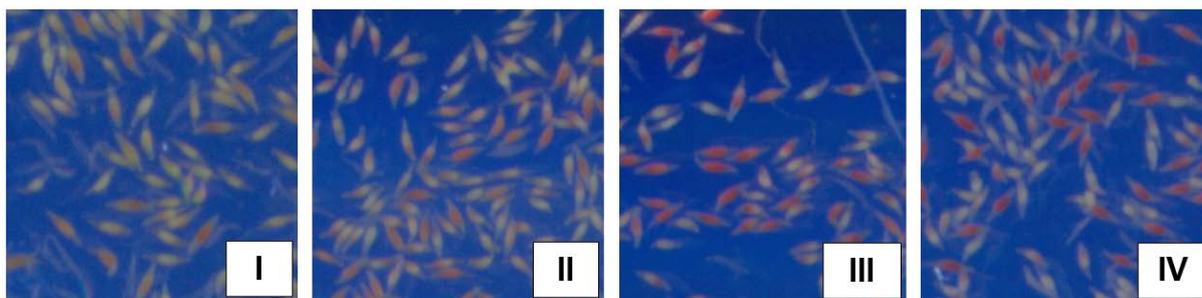
solução de tetrazólio penetrar nos tecidos da semente, a semente perde água para a solução, dificultando a identificação da viabilidade. No presente trabalho, considerando que as sementes passaram por pré-condicionamento em soluções de sacarose ou glicose 10%, essa perda de água deixaria de ocorrer, permitindo que concentrações maiores do sal reagissem melhor aos tecidos do embrião.

O uso de pré-condicionamento em solução de sacarose ou glicose 10%, o uso da solução de tetrazólio a 1,0% e a exposição das sementes por 24 horas são de suma importância para melhorar a coloração das sementes e minimizar os erros de leitura pelo analista de sementes. Em sementes de orquídeas *Trichocentrum jonesianum* o pré-condicionamento em água já seria suficiente para melhorar os resultados do teste de tetrazólio (LALLANA; GARCIA, 2013).

Arditti (1992) e Pridgeon et al. (1999) expõem que a embebição de sementes de orquídeas pode ser difícil, uma vez que sua superfície é geralmente provida de ornamentações que facilitam a dispersão, mas dificultam a embebição. Desta forma, o uso de pré-condicionamento em solução de açúcar por 24 horas seria importante para permitir o contato mais prolongado das sementes com a solução de embebição, favorecendo o ganho de água e a ativação das enzimas da cadeia respiratória do embrião antes de exposição das sementes à solução de tetrazólio (CUSTÓDIO et al., 2016).

Na Figura 2.8 é possível verificar que em sementes submetidas ao teste de tetrazólio sem o uso de pré-condicionamento a coloração fica mais instável, dificultando a leitura do teste. Já sementes pré-condicionadas em solução de açúcar e expostas por 24 horas à solução de tetrazólio 1,0% apresentam coloração bem evidenciada, facilitando a determinação das sementes viáveis.

FIGURA 2.8 - Sementes de *Cattleya labiata* submetidas ao teste de tetrazólio em diferentes condições de pré-condicionamento, concentração dos sais de tetrazólio, tempo de exposição e uso de solução tampão. I – Sementes sem pré-condicionamento, submetidas a solução de tetrazólio a 0,1% por 3h; II – Sementes pré-condicionadas em água, submetidas a solução de tetrazólio a 1,0% por 24h; III – Sementes pré-condicionadas em solução de glicose a 10%, submetidas a solução de tetrazólio a 1,0% por 24h; IV – Sementes pré-condicionadas em solução de sacarose a 10%, submetidas a solução tamponada de tetrazólio a 1,0% por 24h.



Em consonância com Hosomi et al. (2012), o uso de pré-condicionamento em solução de sacarose 10% permitiu estabelecer uma alta correlação dos resultados obtidos no teste de tetrazólio e no teste de germinação para sementes de orquídeas do gênero *Cattleya*. Quanto ao tipo de açúcar empregado no pré-condicionamento, pelos dados do presente trabalho não houve diferenças significativas entre glicose e sacarose. No entanto, por uma questão econômica e de facilidade de obtenção, recomenda-se o uso de sacarose.

2.5 Conclusões

Os resultados do teste de tetrazólio de sementes de orquídeas pré-condicionadas em solução de glicose ou sacarose 10% mostrou-se consistente para a melhor identificação das sementes viáveis;

O uso de solução tampão na diluição do sal de tetrazólio não apresentou diferença em relação à diluição em água;

Os valores de viabilidade mais elevados foram detectados para ambas as amostras de sementes quando foram testados com solução de tetrazólio a 1,0% durante 24 horas.

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. **Fundamentals of orchid biology**. Toronto: John Wiley & Sons, 1992. 691p.
- BERTOLINI, V.; DAMON, A.; VELÁQUEZ, A.N.R. Symbiotic germination of three species of epiphytic orchids susceptible to genetic erosion, from soconusco (Chiapas, Mexico). **European Journal of Environmental Sciences**, v. 1, p. 60–68, 2001.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análises de sementes**. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 2009.
- CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 5. ed. Funep: Jaboticabal, 2012. 590 p.
- CHASE, M.W. et al. An update classification of Orchidaceae. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 177, n. 2, p. 151-174, 2015.
- CUSTÓDIO, C.C. Testes rápidos para avaliação do vigor de sementes: uma revisão. **Colloquium Agrariae**, v. 1, n. 1, p. 29-41, 2005.
- CUSTÓDIO, C.C; DAMASCENO, R.L; MACHADO NETO, N.B. Imagens digitalizadas na interpretação do teste de tetrazólio em sementes de *Brachiaria brizantha*. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 34, n. 2, p. 334-341, 2012.
- CUSTÓDIO, C.C. et al. Improved tetrazolium viability testing in orchid seeds with a thick carapace (*Dactylorhiza fuchsii*) or dark seed coat (*Vanda curvifolia*). **Seed Science and Technology**, v. 44, n. 1, p. 177-188, 2016.
- DEEPTI, S.; GAYATRI, M.C.; SITIKANTHA, S. In vitro seed germination as an aid to conserve *Aerides maculosum* Lindl., an endemic and endangered orchid of western ghats, India. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 4, n. 2, p. 478-486, 2013.
- DEEPTI, S.; GAYATRI, M.C.; SITIKANTHA, S. In vitro seed germination and plant regeneration of an epiphytic orchid *Aerides ringens* (Lindl.) Fischer. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 14, p. 574-580, 2015.
- DIAS, M.C.L.L.; ALVES, S.J. Avaliação da viabilidade de sementes de *Panicum maximum* Jacq pelo teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 30, n. 3, p. 152-158, 2008.
- DOWLING, N.; JUSAITIS, M. Asymbiotic in vitro germination and seed quality assessment of Australian terrestrial orchids. **Australian Journal of Botany**, v. 60, n. 7, p. 592-601, 2012.

DÜBBERN DE SOUZA, F. H. Preparo de soluções neutras de tetrazólio. **Comunicado Técnico Embrapa**, n. 51, set. de 1994. Disponível em: <<http://old.cnpqg.embrapa.br/publicacoes/cot/COT51.html>> Acesso em: 20 abr. 2015.

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, D.F. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e Agrotecnologia** [online], v. 38, n. 2, p. 109-112, 2014.

FRANÇA NETO, J.B.; KRZYZANOWSKI, F.C.; COSTA, N.P. **O teste de tetrazólio em sementes de soja**. Londrina: EMBRAPA-CNPSo, 1998. 72 p.

HOSOMI, S.T. et al. Pre-conditioning *Cattleya* seeds to improve the efficacy of the tetrazolium test for viability. **Seed Science and Technology**, v. 39, n. 1, p. 178-189, 2011.

HOSOMI, S.T. et al. Improved assessment of viability and germination of *Cattleya* (Orchidaceae) seeds following storage. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 48, n. 1, p. 127-136, 2012.

LAZAROTTO, M. et al. Adequação do teste de tetrazólio para avaliação da qualidade de sementes de *Ceiba speciosa*. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. 4, p. 1243-1250, 2011.

LALLANA, V.H.; GARCÍA, L.F. Efecto de pretratamientos em la prueba de viabilidad de semillas de *Trichocentrum jonesianum* (Orchidaceae). **Investigación Agraria**, v. 15, n. 22, p. 129-132, 2013.

MACEDO M.C. et al. Seed storage and acclimatization of *Brassavola tuberculata* Hook. **Semin.: Ciência Agrária**, v. 35, n. 6, p. 2883-2894, 2014.

MACHADO NETO, N.B.; CUSTÓDIO, C.C. A medium for non-commercial sowing of orchid seed. **Selbyana**, v. 26, n. 1-2, p. 316-317, 2005.

MARCOS-FILHO, J. Seed vigor testing: An overview of the past, present and future perspective. **Sciencia Agricola**, v. 72, n. 4, p. 363-374, 2015.

MENDONÇA, E.A.F.; COELHO, M.F.B.; LUCHESE, M. Teste de tetrazólio em sementes de mangaba-brava (*Lafoensia pacari* St. Hil. - Lythraceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, n. 2, p. 33-38, 2006.

OLIVEIRA, L.M.; CARVALHO, M.L.M.; DAVIDE, A.C. Utilização do teste de tetrazólio para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de Canafístula (*Peltophorum dubium* (Sprengel) Tauber – Caesalpinoideae). **Informativo ABRATES**, v. 11, n. 2, p. 118, 2001.

PRIDGEON, A.M. et al. **Genera Orchidacearum- General introduction, Apostasioideae, Cypripedioideae**. Oxford: Oxford University, 1999. 64 p.

RASMUSSEN, H.N. Methods of studying field germination and seedling physiology: present potential and drawbacks. **European Journal of Environmental Sciences**, v. 1, n. 2, p. 55–59, 2011.

REED, B.M. et al. Biodiversity conservation and conservation biotechnology tools. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 47, p. 1-4, 2011.

SALAZAR-MERCADO, A. Germinación asimbiótica de semillas y desarrollo in vitro de plântulas de *Cattleya mendelli* Dombrain (Orchidaceae). **Acta Agronómica**, v. 61, n. 1, p. 69-78, 2012.

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 en management**. Cambridge: University Press, 1989. p. 17-29.

SOARES, J.S. et al. Identificação da viabilidade de sementes de orquídeas pelo teste de tetrazólio. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n. 5, p. 2275-2284, 2014.

SOUZA, C.R. et al. Tetrazolium test for evaluating triticale seed viability. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, n. 3, p. 163-169, 2010.

SWARTS, N.D.; DIXON, K.W. Terrestrial orchid conservation in the age of extinction. **Annals of Botany**, v.104, p. 543–556, 2009.

YAM, T.W.; ARDITTI, J.; CAMERON, K.M. The Orchids Have Been a Splendid Sport — an alternative look at Charles Darwin's contribution to orchid biology. **American Journal of Botany**, v. 96, p. 2128–2154, 2009.

3 CAPÍTULO III: PREDIÇÃO DA LONGEVIDADE DE SEMENTES DE ORQUÍDEAS DO GÊNERO *Cattleya* ARMAZENADAS EM BANCO DE SEMENTES

RESUMO - A intensa degradação de habitats pela ação humana tem sido um dos fatores decisivos para a inserção de diversas espécies da família Orchidaceae nas chamadas listas vermelhas, que reúnem organismos ameaçados de extinção em diferentes graus. Nesse sentido, a comunidade científica tem desenvolvido diferentes estratégias para promover a conservação de espécies, as quais podem ser implementadas *in situ*, isto é, na natureza, ou *ex situ*, em ambientes não naturais para a espécie em questão. A conservação *ex situ* de plantas compreende a manutenção de sementes, tecidos ou indivíduos em bancos de germoplasma, sendo os bancos de sementes uma das estratégias mais viáveis para a conservação de orquídeas. Nessas coleções, sementes de muitas espécies podem ser mantidas em baixas condições de umidade e temperatura sem perder a viabilidade em longo prazo, ocupando pouco espaço, a custos relativamente reduzidos. Em 2008 a Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE – iniciou o estabelecimento de um banco de sementes em parceria com o projeto "Armazenamento de Sementes de Orquídea para Uso Sustentável" – Orchid Seed Stores for Sustainable Use (OSSSU) – da Darwin Initiative. Atualmente o banco conta com 350 amostras de sementes provenientes de orquidários certificados, que realizam polinização cruzada entre os espécimes. As amostras pertencentes a 133 espécies diferentes estão estocadas a -18 °C; destas, 58 pertencem ao gênero *Cattleya*, sendo 22 indicadas em listas vermelhas. No presente estudo foram avaliados 36 amostras de sementes deste gênero pelo teste de tetrazólio. O armazenamento a -18°C mostrou-se eficiente para quase todas as amostras de sementes, com média de longevidade de 83,6 anos, exceto para *Cattleya harpophylla* com um P₅₀ de apenas 4,5 anos.

Palavras-chave: Conservação *ex situ*. Orchidaceae. Teste de tetrazólio.

Physiological quality evaluation of *Cattleya* seeds stored at Unoeste's orchid seed bank through tetrazolium test

ABSTRACT- Intense habitats degradation by human action has been one of the decisive factors for the insertion of several Orchidaceae family species in red lists, which congregate organisms threatened of extinction at different degrees. In this sense, scientific community has developed different strategies to promote species conservation, which can be implemented *in situ*, i.e., in nature, or *ex situ*, in unnatural environments for the species in question. *Ex situ* plant conservation includes the maintenance of seeds, tissues or individuals in germplasm banks, being seed banks one of the most viable strategies for orchid conservation. In these collections, seeds of many species can be kept at low humidity and temperature conditions without losing long term viability, taking up little space, at relatively low costs. In 2008, Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE - started the establishment of a seed bank in partnership with the Orchid Seed Stores for Sustainable Use (OSSSU) Project - from Darwin Initiative. Currently, this bank has 350 seed lots from certified orchid houses, which cross-pollinate the specimens. Samples of 133 different species are stored at -18° C; of these, 58 belong to the genus *Cattleya*, being 22 indicated in red lists. In the present study, 36 seed lots of this genus were evaluated by tetrazolium test. Storage at -18° C proved to be efficient for almost all seed lots, exhibiting an average longevity of 83.6 years, except for *Cattleya harpophylla* which has a P_{50} of only 4.5 years.

Key-words: *Ex situ* conservation. Germplasm. Orchidaceae.

3.1 Introdução

A necessidade de conservação dos recursos genéticos é atualmente uma das questões mais importantes e incontroversas da humanidade. Em plena mudança global, onde os ecossistemas enfrentam grandes alterações climáticas e fortes pressões antropogênicas, a erosão e perda de diversidade genética são uma realidade cada vez mais atual (SEATON et al., 2010).

Diante disso, surge a necessidade do desenvolvimento de iniciativas para o uso sustentável da diversidade biológica, merecendo destaque a criação de bancos de sementes, os quais abrigam coleções-base para a conservação da ampla variabilidade genética vegetal. A conservação da biodiversidade é de grande importância não só pelos benefícios diretos de que pode usufruir a humanidade, como também pela função central desempenhada pelas plantas no funcionamento de todos os sistemas naturais (SEATON; PRITCHARD, 2011).

A conservação é, tradicionalmente, agrupada em duas categorias: a conservação *in situ* e a *ex situ*, que se diferenciam pelo local onde são realizadas. Bancos de sementes constituem-se estratégias de conservação *ex situ*, sendo seu estabelecimento fundamental para a conservação das espécies cultivadas e silvestres (ALVAREZ-PARDO; FERREIRA, 2006; SEATON; PRITCHARD, 2008).

As orquídeas (Família Orchidaceae) compõem o segundo maior grupo de plantas entre as Angiospermas, com mais de 26.000 espécies distribuídas em cerca de 736 gêneros (CHASE et al., 2015). Excluindo o número de híbridos artificiais, no Brasil ocorrem cerca de 200 gêneros e 2.500 espécies (FORZZA et al., 2013). São utilizadas principalmente para ornamentação e por esse motivo vêm sendo intensamente exploradas, o que, juntamente com a intensa degradação de seus habitats, tem resultado na extinção localizada de populações nativas (KOOPOWITZ, 2001).

Apesar de haver possibilidade de propagação de orquídeas ameaçadas de extinção *in vitro*, a partir da germinação de sementes em meio apropriado (LONG et al., 2010; ÁVILA-DIAZ et al., 2009), esta não é uma estratégia fácil de seguir para todos os taxa. Bancos de semente são uma alternativa para o armazenamento de propágulos por longos prazos (MACHADO NETO; CUSTÓDIO, 2005b), principalmente em orquídeas, pois suas sementes são pequenas e cada cápsula pode conter de centenas a milhões de sementes (ARDITTI; GHANI, 2000).

As sementes têm sido divididas em duas categorias: sementes ortodoxas, que toleram dessecação e baixas temperaturas durante a estocagem, apresentando longevidade variável dependendo da espécie; e sementes recalcitrantes ou não ortodoxas, que não toleram perda de água e/ou baixas temperaturas de estocagem (ROBERTS, 1973). Uma terceira categoria, sementes intermediárias, foi definida por Ellis, Hong e Robert (1990), inclui sementes que toleram alguma perda de água e frio na estocagem, mas não permanecem viáveis por longos períodos.

Pritchard e Seaton (1993) sugeriram outra classificação, segundo a qual as sementes pertenceriam a duas categorias: ortodoxas e intermediárias (ou recalcitrantes). As sementes ortodoxas seriam as que toleram dessecação e umidade de cerca de 30% ou menos, podendo ser subdivididas em dois grupos quanto ao comportamento de estocagem: as verdadeiramente ortodoxas e as essencialmente ortodoxas. As espécies verdadeiramente ortodoxas podem ser preservadas em longo prazo sob condições convencionais e por esta razão são adotadas pela maioria dos bancos de sementes. Em contraste, sementes essencialmente ortodoxas apresentam longevidade reduzida em baixas temperaturas ou temperaturas negativas com sementes mais secas. Sementes que não podem ser armazenadas em baixas temperatura e umidade, são as intermediárias ou recalcitrantes, uma vez que não toleram dessecação, ou armazenamento em condições de câmara fria (MACHADO NETO; CUSTÓDIO, 2005b).

As informações para armazenamento de sementes de orquídeas são limitadas, e ainda há algumas divergências entre autores quanto ao que são consideradas as condições mais adequadas (PRITCHARD; SEATON, 1993; MACHADO NETO; CUSTÓDIO, 2005a). Algumas sementes de orquídeas podem ter duração curta, apenas três meses, quando armazenadas com baixo teor de água a 4 °C (MACHADO NETO; CUSTÓDIO, 2005b), enquanto o armazenamento em temperatura mais baixa (sub-zero, -18 °C) é considerado mais adequado para armazenamento de longo prazo (SEATON; PRITCHARD, 2008).

A rápida determinação do potencial fisiológico das sementes é fundamental para que os bancos de sementes utilizem seus recursos de forma racional; já os testes para avaliação de vigor têm grande importância na tomada de decisão quanto ao armazenamento de lotes específicos. Desta forma, diferentes conjuntos de procedimentos para a avaliação da qualidade das sementes têm sido

empregados, especialmente os que permitem a identificação de lotes com alto ou baixo vigor (MCDONALD, 1998).

Dos testes bioquímicos um dos mais utilizados é o teste de tetrazólio, que avalia a viabilidade e o vigor das sementes com base na alteração da coloração de seus tecidos em presença de uma solução contendo o 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio. Este composto é reduzido pelas enzimas desidrogenases dos tecidos vivos, resultando numa substância conhecida por trifetilformazan, de coloração avermelhada. Além de determinar se as sementes são ou não viáveis, o teste é capaz de diagnosticar as possíveis causas que levaram à perda da qualidade do lote avaliado (FRANÇA NETO et al., 1998).

O teste de tetrazólio é utilizado para identificar fatores que influenciam na qualidade das sementes de grandes culturas, como danos mecânicos, danos ocasionados por secagem, insetos e deterioração por umidade (KRZYZANOWSKI et al., 1999). De modo geral, as sementes que são conduzidas ao teste de tetrazólio devem ser pré-condicionadas, procedimento que, além de provocar o amolecimento da semente e facilitar a penetração de solução de tetrazólio, também ativa o sistema enzimático que resulta numa coloração mais nítida.

A determinação da viabilidade e do vigor das sementes após o beneficiamento não é suficiente para estimar mudanças da qualidade fisiológica durante o armazenamento. Sendo assim, para prever a longevidade de sementes em condições controladas de temperatura e umidade, Roberts (1973) determinou a equação básica de viabilidade, a princípio para sementes de trigo e arroz, estendendo-se, posteriormente sua aplicação para um grande número de espécies.

Ellis (1984) observou que a duração de vida das sementes se apresentava em distribuição normal e que suas curvas de sobrevivência eram sigmoidais cumulativas negativas. Isso foi verificado graças à plotagem linear de valores denominados 'probits' - valores de viabilidade das sementes em porcentagem – ao longo do período de armazenamento das sementes (dias), de acordo com a fórmula

$$v = K_i - p (1/\sigma),$$

onde v é o probit da viabilidade das sementes (em porcentagem) após o armazenamento no tempo p ; p é o período de armazenamento em dias; K_i é o

ponto de origem da curva de sobrevivência das sementes no tempo zero ou, em outras palavras, é o valor de probit da viabilidade inicial, que significa o ponto de interceptação do eixo das ordenadas (y) da curva de sobrevivência transformada; $1/\sigma$ é a inclinação da curva de sobrevivência transformada, onde σ é o tempo observado para que a viabilidade caia para um probit, ou seja, representa a medição de sua longevidade, reduzindo a viabilidade de 84,1 para 50,0%, por exemplo.

Existe uma relação logarítmica inversa entre o grau de umidade e a longevidade das sementes na faixa de grau de umidade entre 5 a 25% conforme descrito por Ellis (1984) através da equação:

$$\log \sigma = K - C_w \log m$$

onde K é a constante da interceptação a 1% de umidade das sementes, da regressão entre $\log \sigma$ e o logaritmo do grau de umidade da semente (m) e C_w a constante de viabilidade para o gradiente que descreve os efeitos relativos da umidade na longevidade. Entre as espécies existem diferenças no efeito relativo de umidade (C_w).

Segundo Ellis (1984), os efeitos da temperatura são significativos e não lineares em relação à longevidade de sementes e podem ser descritos como:

$$\log \sigma = K - C_H t - C_Q t^2$$

onde K é a constante, representada pelo ponto em que a curva de sobrevivência corta o eixo Y ; C_H e C_Q são constantes de viabilidade, as quais quando combinadas refletem a sensibilidade da longevidade à temperatura.

A equação aperfeiçoada de viabilidade proposta por Ellis e Roberts (1980) inclui cinco constantes:

- duas constantes de temperatura linear e quadrática (C_H e C_Q , respectivamente)
- uma constante para cada espécie: K_E ;
- uma constante que indica a resposta logarítmica da longevidade das sementes para o grau de umidade: C_W ;
- uma constante que quantifica a qualidade inicial do lote de sementes antes do armazenamento: K_i .

Para qualquer lote homogêneo de sementes, dentro de uma grande faixa de condições de armazenamento, essas constantes podem ser empregadas para a previsão da longevidade das sementes.

Os valores de σ obtidos são utilizados na determinação das constantes K e C_w por regressão linear utilizando a equação:

$$\log \sigma = K - C_w \log m,$$

onde K é o ponto de interceptação no eixo Y da regressão entre $\log \sigma$ e $\log m$, sendo m o grau de umidade das sementes. A constante de viabilidade K_E da equação aperfeiçoada de viabilidade pode também ser estimada adotando-se a equação abaixo:

$$K_E = K + C_H t - C_Q t^2$$

Onde K é o ponto de interceptação da regressão no eixo Y, C_H e C_Q são constantes que descrevem os efeitos da temperatura t na longevidade e t é a temperatura do armazenamento em °C. As constantes K_E , C_w , C_H e C_Q são valores que podem ser usados na previsão da percentagem de germinação em probit (v), após qualquer período de armazenamento em diferentes valores de temperatura e de umidade das sementes, utilizando-se da equação:

$$v = K_i - p/10^{K_E - C_w \log m - C_H t - C_Q t^2}$$

onde:

v = percentagem de viabilidade prevista;

p = período de tempo em dias;

m = grau de umidade das sementes;

t = temperatura de armazenamento (°C);

K_E = constante para cada espécie;

K_i = constante que quantifica a qualidade inicial de cada lote de sementes antes do armazenamento;

C_w = indica a resposta logarítmica da longevidade das sementes para o grau de umidade;

C_H e C_Q = são constantes linear e quadrática da temperatura, respectivamente e descrevem o efeito da temperatura de armazenamento sobre a longevidade das sementes.

Esta equação foi testada com valores constantes para sementes de cevada e abrangendo uma grande faixa de condições ambientais e posteriormente foi comprovada a possibilidade de sua utilização para outras espécies vegetais. A equação de Ellis e Roberts (1980) prevê a porcentagem de viabilidade esperada para qualquer lote de sementes durante o armazenamento em diferentes valores de temperatura e grau de umidade das sementes.

Newton, Hay e Probert (2014) realizaram uma modificação nas equações anteriores com a finalidade de prever a longevidade de cada lote de sementes a partir de dados comparativos de amostras mantidas sob mesma temperatura e teor de água na semente.

Os valores σ e P_{50} foram calculados pela fórmula:

$$V = K_i - (p / \sigma)$$

Onde V é a viabilidade (em probits) da coleta após p dias no ambiente armazenado. K_i é o intercepto-y e uma medida da germinação inicial da semente (em probits), σ (sigma) é o tempo para a viabilidade cair em 1 probit. O tempo de diminuição da viabilidade para 50% (P_{50}) pode ser lido na curva de sobrevivência da semente ou calculado usando a equação:

$$p_{50} = K_i \times \sigma$$

onde os valores de P_{50} são usados para classificar as espécies, permitindo comparações de longevidade entre as espécies.

O êxito dos programas de conservação *ex situ* como bancos de sementes depende da capacidade de prever a longevidade das sementes para a elaboração das melhores estratégias de armazenamento e tempo adequado de propagação do material armazenado, além de favorecer um estudo de seu comportamento e fisiologia.

3.2 Objetivos

Avaliar a qualidade fisiológica das sementes de *Cattleya* armazenadas no banco de sementes de orquídeas da UNOESTE utilizando o teste de tetrazólio e a comparação dos dados de viabilidade obtidos antes e após o armazenamento em baixa temperatura, contribuindo para verificar a influência do tempo na viabilidade e longevidade das sementes armazenadas.

3.3 Material e Métodos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Células e Tecidos Vegetais da Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE – Presidente Prudente – SP).

Sementes de orquídeas foram armazenadas a partir do ano de 2008 e novas amostras de frutos foram coletadas, em diferentes períodos, no Orquidário Aurora (Taciba - SP). As cápsulas coletadas foram colocadas em envelope de papel, e mantidas em temperatura ambiente até a deiscência dos frutos. As sementes obtidas foram armazenadas em envelope de papel sobre sílica gel a 4 °C, com 6,5% de umidade (BRASIL, 2009) até o início dos testes de viabilidade. Posteriormente o armazenamento se deu em freezer a -18 °C, com as sementes acondicionadas em microtubos mantidos em frascos de vidro hermeticamente fechados contendo sílica gel.

O banco de sementes de orquídeas da Unoeste conta atualmente com 350 amostras de sementes armazenados a -18 °C conforme protocolo do OSSSU-Project (SEATON; PRITCHARD, 2011). Nesses 350 lotes estão representadas amostras de 133 espécies de orquídeas, dentre as quais 58 pertencem ao gênero *Cattleya*, estando 22 delas relatadas em diferentes listas vermelhas.

O presente estudo relata os resultados obtidos na avaliação de 36 amostras de sementes de orquídeas. Destes, três pertencem às espécies *Laelia anceps* (uma amostra) e *Guarianthe bowringiana* (duas amostras), que já foram anteriormente classificadas como pertencentes ao gênero *Cattleya*. As outras 33 amostras pertencem a 32 espécies do gênero *Cattleya* (Tabela 3.1), sendo *C. alvaroana* representada por dois lotes (Tabela 3.2).

Das 34 espécies analisadas, quatro não são descritas em território brasileiro: *Laelia anceps*, originária do México e Honduras, *G. bowringiana* encontrada em Belize e Guatemala, *C. mossiae* presente na Venezuela e *C. warscewiczii* de origem colombiana. Das 22 espécies citadas na lista vermelha da flora brasileira de 2014, *C. endsfeldzii* é classificada como “CR - criticamente em perigo (critically endangered)” e sete espécies são consideradas “EN - em perigo (endangered)”: *C. briegeri*, *C. caulescens*, *C. hoehnei*, *C. jongheana*, *C. schilleriana*, *C. tenebrosa* e *C. tenuis*. Há ainda nove espécies classificadas como “VU - vulneráveis (vulnerable)” (*C. granulosa*, *C. harpophylla*, *C. harrisoniana*, *C.*

intermedia, *C. labiata*, *C. purpurata*, *C. tigrina*, *C. walkeriana*, *C. warneri*), duas espécies descritas como “NT - quase ameaçadas (near threatened)” (*C. amethystoglossa* e *C. nobilior*) e, por fim, duas espécies listadas como “LC - Menos preocupante (least concern)”: *C. cernua* e *C. cinnabarina* (BRASIL, 2014).

Cinco estados brasileiros tem publicadas listas de espécies da flora ameaçadas de extinção. No presente estudo foram analisadas duas espécies descritas como “vulneráveis” na lista vermelha da flora do estado de São Paulo (*C. purpurata* e *C. tigrina*) (SMA, 2016). Da lista vermelha da flora do estado do Rio Grande do Sul (SEMA, 2014) foram analisadas três espécies descritas como “vulneráveis”: *C. intermedia*, *C. purpurata* e *C. tigrina*. Já entre as espécies que constam na lista vermelha do estado de Santa Catarina (CONSEMA, 2014) foi analisada uma descrita como “em perigo”: a orquídea *C. purpurata*. Com referência à lista do estado do Espírito Santo (SIMONELLI; FRAGA, 2007) analisaram-se sete espécies de *Cattleya*, sendo quatro classificadas como “criticamente em perigo” (*C. labiata*, *C. pumila*, *C. schilleriana* e *C. tenebrosa*); uma como “em perigo” (*C. hoehnei*) e duas como “vulneráveis” (*C. harpophylla* e *C. harrisoniana*). Por fim, em relação à lista vermelha publicada pelo estado de Minas Gerais (COPAM, 1997) foram analisadas quatro espécies do gênero *Cattleya*, sendo 3 “criticamente em perigo” (*C. amethystoglossa*, *C. jongheana* e *C. warneri*) e uma como “em perigo” (*C. harpophylla*).

Entre as 36 espécies analisadas no presente estudo, apenas 10 constavam na lista de espécies da flora consideradas ameaçadas pelo Ministério do Meio Ambiente no ano de 1998 (BRASIL, 1998): *C. briegei*, *C. caulescens*, *C. endsfeldzii*, *C. granulosa*, *C. jongheana*, *C. labiata*, *C. schilleriana*, *C. tenebrosa*, *C. tenuis* e *C. warneri*. Já na lista atualizada, divulgada em 2014, constam 22 espécies analisadas no presente trabalho.

Na lista Apêndice II do CITES (Convenção sobre o Comércio Internacional de Espécies da Fauna e Flora Selvagem Ameaçadas de Extinção) de 2012 (CNCFLORA, 2012) constam 13 espécies de *Cattleya* integrantes do presente estudo: *C. briegei*, *C. caulescens*, *C. cernua*, *C. cinnabarina*, *C. endsfeldzii*, *C. harpophylla*, *C. hoehnei*, *C. jongheana*, *C. purpurata*, *C. schilleriana*, *C. tenebrosa*, *C. tigrina* e *C. walkeriana*.

As 30 espécies brasileiras de *Cattleya* englobadas pelo estudo realizado podem ser encontradas no bioma Mata Atlântica, uma vez que ele

apresenta diferentes fisionomias. Há nove espécies de *Cattleya* analisadas que podem ser encontradas no bioma Cerrado e três espécies no bioma caatinga (Tabela 3.1).

TABELA 3.1 - Relação dos lotes de sementes das espécies de orquídeas utilizados, distribuição geográfica e identificação dos biomas e hábitos, grau de ameaça (EX- Extinta, EW- Extinta na natureza, CR- Criticamente em perigo, EN- Em perigo, VU- Vulnerável, NT-Quase ameaçada, LC- Menos preocupante, DD- Dados insuficientes, NE-Não avaliada).

Espécie	Distribuição geográfica ¹	Bioma / Hábitos ¹	Grau de ameaça
<i>Cattleya alvaroana</i> (F.E.L.Miranda) Van den Berg	RJ	Mata Atlântica / Epífita	NE
<i>Cattleya amethystoglossa</i> Linden & Rchb.f.	MG, ES, BA	Mata Atlântica, Caatinga / Epífitas ou rupícola	NT ¹ , CR ⁴
<i>Laelia anceps</i> [Lindley] Beer	México / Honduras	Epífita	NE
<i>Cattleya angereri</i> (Pabst) Van den Berg	MG	Mata Atlântica / Epífita	NE
<i>Cattleya blumenscheinii</i> (Pabst) Van den Berg	MG, ES	Mata Atlântica / Rupícola	NE
<i>Guarianthe bowringiana</i> Veitch	Belize / Guatemala	Rupícola	NE
<i>Cattleya brevicaulis</i> (HG Jones) Van den Berg	MG, ES	Cerrado, Mata Atlântica / Rupícola	NE
<i>Cattleya briegeri</i> (Blumensch. ex Pabst) Van den Berg	MG	Campos rupestres / Rupícola	EN ¹ , DD ⁵ , CITES II ¹
<i>Cattleya caulescens</i> (Lindl.) Van den Berg	MG	Campos rupestres / Rupícola	EN ¹ , DD ⁵ , CITES II ¹
<i>Cattleya cernua</i> (Lindl.) Van den Berg	BA, MS, MG, SP, RJ, PR, SC, RS	Cerrado, Mata Atlântica / Epífita ou rupícola	LC ¹ , CITES II ¹
<i>Cattleya cinnabarina</i> (Bateman ex Lindl.) Van den Berg	MG, SP, RJ	Cerrado, Mata Atlântica / Epífita ou rupícola	LC ¹ , CITES II ⁵
<i>Cattleya endsfeldzii</i> (Pabst) Van den Berg	MG	Mata Atlântica / Rupícola	CR ¹ , VU ⁵ , CITES II ⁵
<i>Cattleya granulosa</i> Lindl.	BA, PB, RN, PE, AL, ES	Mata Atlântica / Epífita	VU ¹ , VU ⁵
<i>Cattleya harpophylla</i> (Rchb.f.) Van den Berg	MG, ES	Mata Atlântica / Epífita	VU ¹ , EN ⁴ , VU ⁶ , CITES II ¹

<i>Cattleya harrisoniana</i> Bateman ex Lindl.	MG, ES, RJ, SP	Mata Atlântica / Epífita	VU ¹ , VU ⁶
<i>Cattleya hegeriana</i> (Campacci) Van den Berg	RJ	Mata Atlântica / Rupícola	NE
<i>Cattleya hoehnei</i> Van den Berg	ES	Mata Atlântica / Rupícola	EN ¹ , CR ⁶ , CITES II ¹
<i>Cattleya intermedia</i> Graham ex Lindl.	RS, SC, PR, SP, RJ	Mata Atlântica / Epífita ou rupícola	VU ¹ , VU ³
<i>Cattleya jongheana</i> (Rchb.f.) Van den Berg	MS, SP, MG, ES	Cerrado, Mata Atlântica / Epífita	EN ¹ , CR ⁴ , EN ⁵ , CITES II ¹
<i>Cattleya labiata</i> Lindl.	RJ, ES, SE, AL, PE, PB, CE	Mata Atlântica, Caatinga / Epífita ou rupícola	VU ¹ , EN ⁵ , CR ⁶
<i>Cattleya lucasiana</i>	MG	Mata Atlântica / Rupícola	NE
<i>Cattleya mossiae</i> C.Parker ex Hook.	Venezuela	Epífita	NE
<i>Cattleya nobilior</i> Rchb.f.	PA, TO, RO, MA, MT, GO, MS,	Cerrado / Epífita	NT ¹
<i>Cattleya pumila</i> Hook.	MG, ES	Mata Atlântica / Rupícola	CR ⁶
<i>Cattleya purpurata</i> (Lindl. & Paxton) Van den Berg	RS, SC, PR, SP, RJ, ES	Mata Atlântica e regiões litorâneas / Epífita e rupícola	VU ¹ , VU ² , VU ³ , EN ⁷ , CITES II ¹
<i>Cattleya rupestris</i> (Lindl.) Van den Berg	MG	Mata Atlântica / Rupícola	NE
<i>Cattleya sanguiloba</i> (Withner) Van den Berg	BA, ES	Mata Atlântica / Rupícola	NE
<i>Cattleya schilleriana</i> Rchb.f.	RJ, ES, BA	Mata Atlântica / Epífita	EN ¹ , CR ⁵ , CR ⁶ , CITES II ¹
<i>Cattleya tenebrosa</i> (Rolfe) A.A. Chadwick	RJ, ES, MG, BA	Mata Atlântica / Epífita ou rupícola	EN ¹ , CR ⁵ , CR ⁶ , CITES II ¹
<i>Cattleya tenuis</i> Campacci & Vedovello	BA, PE	Caatinga, Mata Atlântica / Epífita ou rupícola	EN ¹ , CR ⁵
<i>Cattleya tigrina</i> A.Rich.	RS, SC, SP, BA, SE, PE	Mata Atlântica / Epífitas ou rupícola	VU ¹ , VU ² , VU ³ , CITES II ¹
<i>Cattleya walkeriana</i> Gardner	SP, MS, MT, MG, GO, TO	Mata Atlântica, Cerrado / Epífita ou rupícola	VU ¹ , CITES II ¹
<i>Cattleya warneri</i> T.Moore ex R.Warner	MG, RJ, ES,	Mata Atlântica / Epífita	VU ¹ , VU ⁵ ,

	BA		CR ⁴
<i>Cattleya warscewiczii</i> Rchb.f.	Colômbia	Epífita	--

¹- CNCFlora. *Cattleya* in Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012.2 Centro Nacional de Conservação da Flora. Disponível em <<http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Cattleya>>. Acesso em 10 outubro 2016.

²- Lista Oficial das Espécies da Flora do Estado de São Paulo Ameaçadas de Extinção (SMA-SP, 2016).

³- Lista Oficial das Espécies da Flora Ameaçadas de Extinção do Estado do Rio Grande do Sul (SEMA-RS, 2014).

⁴- Lista das Espécies Ameaçadas de Extinção da Flora do Estado de Minas Gerais (COPAM-MG, 1997).

⁵- Lista Oficial de Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção (BRASIL, Ministério do Meio Ambiente, 2008).

⁶- Lista das Espécies da Flora Ameaçadas de Extinção no Estado do Espírito Santo (SIMONELLI, M.; FRAGA, 2007).

⁷- Lista Oficial das Espécies da Flora Ameaçadas de Extinção no Estado de Santa Catarina (CONSEMA-SC, 2014).

Para a avaliação da viabilidade das sementes pelo teste de tetrazólio foram aliqüotados 10 miligramas de sementes em microtubos e foi realizado o pré-condicionamento através da adição de 1,5mL de solução de sacarose a 10%, por 24 horas. Após este período as sementes foram lavadas duas vezes em água destilada e adicionou-se 1,5mL de solução de tetrazólio (Cloreto de 2,3,5-Trifenil-Tetrazólio) a 1%, submetendo-se a amostra por 24 horas a banho-maria na temperatura de 40 °C, em ambiente escuro (HOSOMI et al., 2011).

A metodologia empregada na determinação da viabilidade das sementes baseia-se na utilização de imagens digitalizadas por computador em substituição ao microscópio estereoscópico, mais amplamente utilizado. Após o período de incubação de cada amostra, descartou-se 1,0 mL da solução de tetrazólio e o restante foi gotejado sobre uma placa de vidro, posicionada ao lado de uma régua de plástico. As imagens foram digitalizadas em resolução de 3600 dpi com a utilização de um scanner de mesa HP Scanjet G2710. As contagens das sementes foram realizadas na tela do computador e as imagens foram modificadas, quando necessário, com o uso do software Adobe Photoshop® CC 2015, através de ferramentas de ampliação de imagem, definição de contraste e brilho. Foram consideradas viáveis as sementes portadoras de embriões coloridos de vermelho, tendo sido consideradas inviáveis as sementes com coloração branca.

Para a contagem da viabilidade das sementes foram marcados três campos em cada imagem e a viabilidade das sementes foi expressa em porcentagem.

Os valores de porcentagem da viabilidade das sementes pelo teste de tetrazólio foram transformados em probit, utilizando-se a tabela proposta por Finney (1952) retirada de Soares e Coelho (2012) (Figura 3.1). Os valores de probit foram aplicados na equação adaptada de Newton, Hay e Probert (2014) com a finalidade de prever a longevidade de cada lote de sementes.

Os valores σ e P_{50} foram calculados pela fórmula:

$$V = K_i - (p / \sigma)$$

onde **V** é a viabilidade (em probits) da coleta após **p** dias no ambiente armazenado. **K_i** é o intercepto-y e uma medida da germinação inicial da semente (em probits), **σ** (sigma) é o tempo para a viabilidade cair em 1 probit. O tempo de diminuição da viabilidade para 50% (P_{50}) pode ser lido na curva de sobrevivência da semente ou calculado usando a equação:

$$p_{50} = K_i \times \sigma$$

onde os valores de P_{50} são usados para classificar as espécies, permitindo comparações de longevidade entre as espécies.

FIGURA 3.1 - Quadro demonstrando a equivalência do valor de probit (Pr) e os valores de porcentagem de viabilidade pelo teste de tetrazólio.

Pr	%								
0.00	0	4.19	21	4.8	42	5.33	63	5.99	84
2.67	1	4.23	22	4.82	43	5.36	64	6.04	85
2.95	2	4.26	23	4.85	44	5.39	65	6.08	86
3.12	3	4.29	24	4.87	45	5.41	66	6.13	87
3.25	4	4.33	25	4.9	46	5.44	67	6.18	88
3.35	5	4.36	26	4.92	47	5.47	68	6.23	89
3.45	6	4.39	27	4.95	48	5.5	69	6.28	90
3.52	7	4.42	28	4.97	49	5.52	70	6.34	91
3.59	8	4.45	29	5	50	5.55	71	6.41	92
3.66	9	4.48	30	5.03	51	5.58	72	6.48	93
3.72	10	4.5	31	5.05	52	5.61	73	6.55	94
3.77	11	4.53	32	5.08	53	5.64	74	6.64	95
3.82	12	4.56	33	5.1	54	5.67	75	6.75	96
3.87	13	4.59	34	5.13	55	5.71	76	6.88	97
3.92	14	4.61	35	5.15	56	5.74	77	7.05	98
3.96	15	4.64	36	5.18	57	5.77	78	7.33	99
4.01	16	4.67	37	5.2	58	5.81	79	7.41	99.2
4.05	17	4.69	38	5.23	59	5.84	80	7.51	99.4
4.08	18	4.72	39	5.25	60	5.88	81	7.65	99.6
4.12	19	4.75	40	5.28	61	5.92	82	7.88	99.8
4.16	20	4.77	41	5.31	62	5.95	83	8.09	99.9

Fonte: (SOARES; COELHO, 2012).

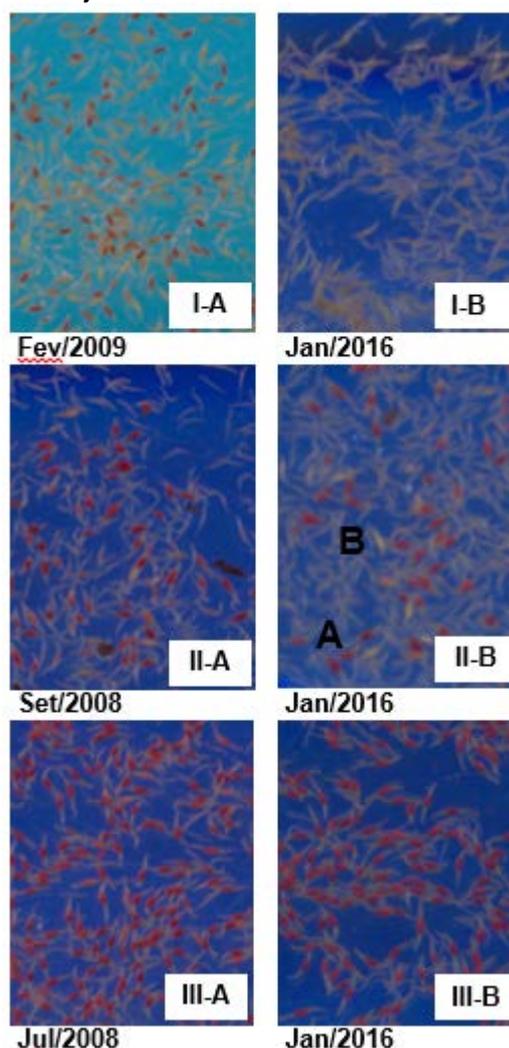
3.4 Resultados e Discussão

O teste de tetrazólio demonstrou-se viável para analisar a qualidade fisiológica das sementes armazenadas no banco por apresentar uma boa correlação com os valores obtidos no teste de germinação para as sementes de orquídeas do gênero *Cattleya* (HOSOMI et al., 2011).

As Figuras 3.2 I-A e I-B referem-se ao teste de tetrazólio aplicado nas amostras de sementes de *C. caetensis*, as quais perderam a viabilidade após 83 meses de armazenamento. Depois desse período não foi possível detectar sementes viáveis (vermelhas) nas imagens, por isso os dados não fazem parte do presente trabalho.

Na Tabela 3.2 e Figuras 3.2 II-A e II-B verifica-se o resultado do teste de tetrazólio aplicado nas sementes de *C. endsfeldzii* antes do armazenamento a -18 °C e após 87 meses de armazenamento. Nesse período o lote perdeu 16% da sua viabilidade, pois em novembro de 2008 a viabilidade era de $85,3 \pm 1,6\%$ e após o armazenamento passou para $69,3 \pm 1,9\%$. Já para as sementes de *C. hegeriana* foi possível observar que não houve perda de coloração das sementes após o período de 89 meses, indicando que não houve perda de viabilidade (Tabela 3.2 e Figuras 3.2 III-A e III-B).

FIGURA 3.2 - Imagens digitalizadas do teste de tetrazólio. A- sementes viáveis, B- sementes mortas. IA – teste de tetrazólio de *C. caetensis* em fevereiro de 2009, IB- teste de tetrazólio de *C. caetensis* de janeiro de 2016, IIA – teste de tetrazólio de *C. endsfeldzii* de setembro de 2008, IIB – teste de tetrazólio de *C. endsfeldzii* de janeiro de 2016, IIIA- teste de tetrazólio *C. hegeriana* de julho de 2008, III-B – teste de tetrazólio de *C. hegeriana* de janeiro de 2016.



Das 36 amostras de sementes de orquídeas do gênero *Cattleya* analisados, seis foram armazenados de agosto de 2008 até a realização dos testes, totalizando 89 meses de armazenamento: *C. granulosa*, *C. hegeriana*, *C. mossiae*, *C. purpurata*, *C. tenuis* e *C. tigrina*. Os lotes mais recentes avaliados foram *C. cinnabarina* e *C. jongheana* armazenadas a partir de setembro e julho de 2013, totalizando 27 e 30 meses de armazenamento respectivamente (Tabela 3.2).

A longevidade de uma determinada espécie pode ser reduzida quando não são empregadas condições adequadas de armazenamento. A deterioração das sementes começa quando elas alcançam sua maturidade fisiológica. O aumento da temperatura de armazenamento provoca aumento das taxas respiratórias da

semente, dos fungos e dos insetos que as acompanham. A deterioração das sementes é irreversível, porém é mínima por ocasião da maturidade fisiológica. Um armazenamento adequado visa manter o vigor e o poder germinativo pelo maior período possível, visto que a qualidade das sementes não é melhorada, mas pode ser mantida com um mínimo de deterioração possível (POPINIGIS, 1985).

Com a evolução do conhecimento sobre a longevidade de sementes, muitas equações têm sido propostas para relacionar as condições de armazenamento com o período de viabilidade das sementes, de modo a permitir uma previsão da sua sobrevivência bem como sua sensibilidade ao grau de umidade e à temperatura (ROBERTS, 1973; ELLIS, 1984; CHAVES; USBERTI, 2003; ANDREOLI, 2004; SINÍCIO et al., 2009; HAY; MEAD; BLOOMBERG, 2014).

Das 36 amostras analisadas, três apresentam uma predição de longevidade abaixo dos 20 anos (*G. bowringiana* – lote 44, *C. harpophylla* e *C. labiata*). Já os lotes de *C. brevicaulis*, *C. caulescens*, *C. granulosa*, *C. harriosoniana*, *C. hegeriana*, *C. intermedia*, *C. rupestres*, *C. schilleriana*, *C. tenebrosa*, *C. walkeriana* e *C. warneri* de apresentaram P_{50} maior que 100 anos (Tabela 3.2 e Figura 3.3). O armazenamento de sementes do gênero *Cattleya* a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ tem se mostrado viável, confirmando os dados de Hosomi et al. (2012), pois de modo geral as amostras de sementes analisadas no presente trabalho apresentam um P_{50} médio de 83,6 anos (Tabela 3.2).

No caso de *G. bowringiana* e *C. alvaroana* foram analisados 2 lotes de cada espécie, que apresentaram valores diferentes de viabilidades. Segundo Carvalho e Nakagawa (2012), uma planta enfraquecida pela ação de qualquer fator ambiental pode originar sementes com viabilidade mais curta, indicando uma possível causa para a diferença entre os lotes de sementes analisados. Apesar de os dois lotes de *C. alvaroana* possuírem o mesmo tempo de armazenamento, a queda de viabilidade foi diferente para cada um deles: no lote 2 foi 98,6% para 89,6% e no lote 7 de 98,7% para 95,8%. Desta forma os lotes 2 e 7 de *C. alvaroana* apresentaram P_{50} de 23,8 e 45,2 anos respectivamente. Para *G. bowringiana* também houve diferenças entre dois lotes analisados (Tabela 3.2). O lote 44, composto por sementes armazenadas por 87 meses, apresentou perda de viabilidade de 90,6% para 38,5%. Já o lote 202, armazenado por 36 meses, teve sua viabilidade reduzida de 76,7% para 74,7%. Sendo assim, o P_{50} para os lotes 44 e 202 foram 14 e 35 anos respectivamente.

TABELA 3.2 - Avaliação da viabilidade dos lotes de sementes de *Cattleya* pelo teste de tetrazólio, antes e após o armazenamento, com valores de P₅₀.

Espécie	Nº lote	Data de armazen.	Período de armazenamento (meses)	Viabilidade das sementes (%)		P ₅₀ (anos)
				Início	Final	
Espécies Brasileiras						
<i>Cattleya alvaroana</i>	2	Set/08	87	98,6±2,4	89,6±1,6	23,8
<i>Cattleya alvaroana</i>	7	Set/08	87	98,7±2,3	95,8±2,4	45,2
<i>Cattleya amethystoglossa</i>	226	Jan/13	36	87,1±2,6	80,6±6,0	36,3
<i>Cattleya angereri</i>	97	Mai/09	74	91,9±2,2	87,6±2,7	84,8
<i>Cattleya blumenscheinii</i>	69	Fev/09	56	56,4±5,2	46,0±5,7	47,4
<i>Cattleya brevicaulis</i>	90	Abr/09	67	94,5±2,7	94,4±1,6	203,1
<i>Cattleya briegei</i>	1	Set/08	87	98,0±1,8	93,1±1,7	44,2
<i>Cattleya caulescens</i>	222	Jan/13	36	93,0±1,5	90,9±1,8	135,5
<i>Cattleya cernua</i>	43	Set/08	87	92,2±3,8	81,6±4,2	46,8
<i>Cattleya cinnabarina</i>	266	Set/13	27	81,0±1,2	78,4±2,0	93,2
<i>Cattleya endsfeldzii</i>	52	Set/08	87	85,3±1,6	69,3±1,9	40,0
<i>Cattleya granulosa</i>	35	Jul/08	89	96,8±0,5	95,9±2,4	193,6
<i>Cattleya harpophylla</i>	171	Jan/13	36	23,2±5,4	20,6±5,3	4,5
<i>Cattleya harrisoniana</i>	13	Set/08	87	98,5±0,7	97,6±0,7	148,3
<i>Cattleya hegeriana</i>	26	Jul/08	89	99,7±0,4	99,7±0,5	155,7
<i>Cattleya hoehnei</i>	9	Set/08	87	96,3±3,9	88,8±2,2	46,4
<i>Cattleya intermedia</i>	8	Set/08	87	95,2±3,0	93,5±4,2	263,8
<i>Cattleya jongheana</i>	265	Jul/13	30	80,6±5,6	75,0±5,3	34,5
<i>Cattleya labiata</i>	137	Jul/10	66	93,8±0,7	60,2±12,5	13,7
<i>Cattleya lucasiana</i>	15	Set/08	87	94,5±1,5	89,4±3,6	73,2
<i>Cattleya nobilior</i>	37	Set/08	87	99,7±0,5	95,8±2,0	27,8
<i>Cattleya pumila</i>	253	Jan/13	36	79,2±3,5	76,0±4,4	86,0
<i>Cattleya purpurata</i>	33	Jul/08	89	97,9±0,6	85,9±6,3	53,5
<i>Cattleya rupestris</i>	94	Jun/10	67	96,4±3,4	96,0±1,1	169,0
<i>Cattleya sanguiloba</i>	3	Set/08	87	94,4±4,5	90,0±4,1	86,7
<i>Cattleya schilleriana</i>	17	Set/08	87	99,6±0,7	99,0±0,9	137,7
<i>Cattleya tenebrosa</i>	113	Jun/10	67	93,0±4,5	92,9±2,7	254,9
<i>Cattleya tenuis</i>	23	Jul/08	89	85,4±2,0	70,5±3,6	45,1
<i>Cattleya tigrina</i>	31	Jul/08	89	99,6±0,8	94,2±4,9	38,9
<i>Cattleya walkeriana</i>	20	Set/08	87	99,8±0,4	99,6±0,7	137,7
<i>Cattleya warneri</i>	14	Set/08	87	96,8±0,8	94,9±1,1	102,5
Espécies Não Brasileiras						
<i>Cattleya mossiae</i>	36	Jul/08	89	73,5±2,5	39,4±10,7	23,1
<i>Cattleya warszewiczii</i>	193	Jan/13	36	82,1±4,2	74,5±1,6	35,0
<i>Guarianthe bowringiana</i>	44	Set/08	87	90,6±3,1	38,5±5,5	14,0
<i>Guarianthe bowringiana</i>	202	Jan/13	36	76,7±5,0	74,7±5,9	35,0
<i>Laelia anceps</i>	6	Set/08	87	86,2±0,6	62,0±3,1	28,2
MEDIA	--	--	--	--	--	83,6

A Tabela 3.2 evidencia algumas situações em que a perda de viabilidade é semelhante, porém gera valores de P_{50} bem diferentes. Um exemplo é fornecido pela comparação entre os dados de viabilidade inicial e final das amostras de sementes de *C. tenebrosa* e *C. walkeriana*. A amostra de sementes de *C. tenebrosa* esteve armazenada por 67 meses e apresentou viabilidade inicial de 93,0% e viabilidade final de 92,7%, com P_{50} de 254,9 anos. Já a amostra de sementes de *C. walkeriana*, que permaneceu armazenado por 87 meses, apresentou viabilidade inicial de 99,8% e viabilidade final de 99,6%, com P_{50} de 137,7 anos. Apesar de a diferença entre a viabilidade final e inicial ser muito semelhante – 0,3 para *C. tenebrosa* e 0,2 para *C. walkeriana* – esta permaneceu armazenada por 87 meses, perdendo apenas 0,2% de sua viabilidade. Já *C. tenebrosa* que esteve armazenada por 67 meses, período em que perdeu 0,3% de viabilidade, portanto presume-se *C. walkeriana* deva ter uma longevidade P_{50} maior que *C. tenebrosa*.

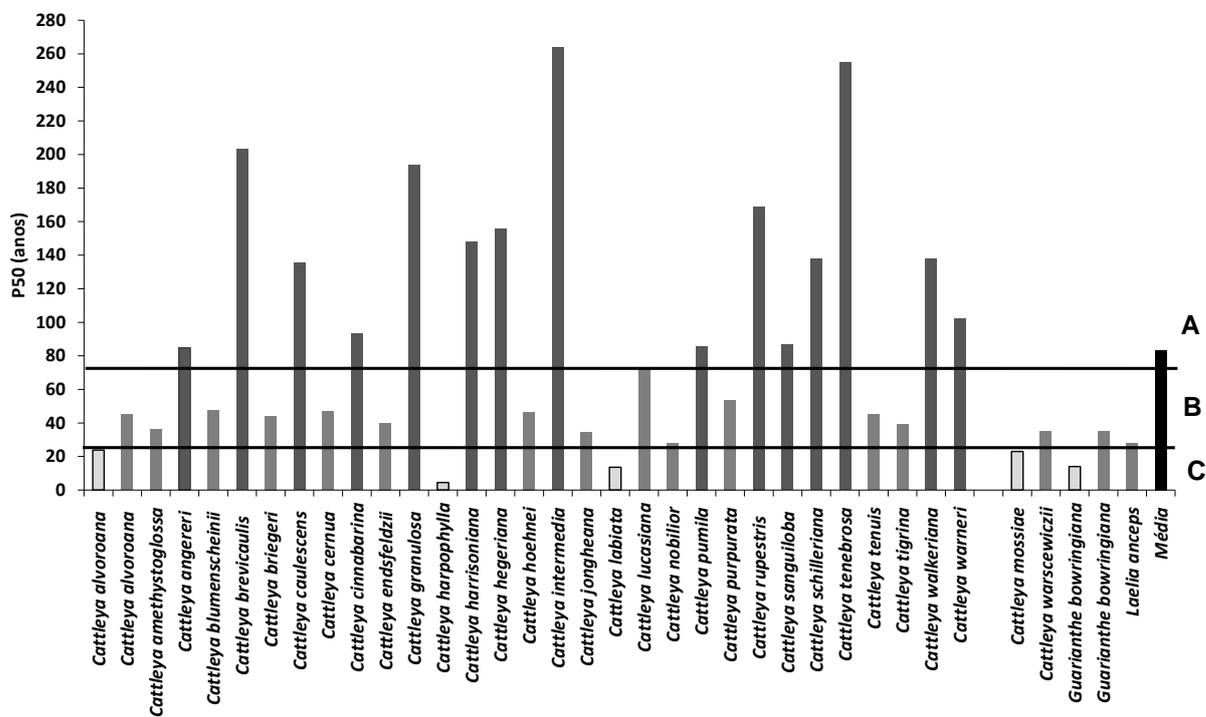
A "análise Probit" é basicamente uma análise de regressão destes dados com viabilidade probit como a variável dependente e o tempo de armazenamento como variável independente. Contudo, devido à distribuição de erro, é uma regressão ponderada. Com viabilidades muito elevadas (95%), ou com viabilidades muito baixas ($\geq 5\%$), uma diferença de 1% na viabilidade tem um grande efeito no valor probit. Por exemplo, 98,0% é equivalente a 7,0537 probits e 99,0% é equivalente a 7,3263 probits, uma diferença de 0,2726 probits. Com viabilidades mais próximas à média, uma diferença de 1% terá um efeito muito menor no valor probit, por exemplo: 50,0% é equivalente a 5,0000 probits e 51% é equivalente a 5,0251 probits, uma diferença de 0,0251 probits (HAY, 2004).

Ewart (1908) e Harington (1972) propuseram uma classificação levando-se em consideração apenas o tempo da viabilidade, separando as espécies em duas categorias: as de vida curta, com longevidade igual ou inferior a 10 anos e as longevas, com longevidade de 10 anos ou superior. Seguindo a classificação desses autores, os dados do presente trabalho sugerem que apenas uma das espécies analisadas (*C. harpophylla*) seria considerada de vida curta (Figura 3.3).

De acordo com Walters, Hill e Wheeler (2005) as sementes ortodoxas mantidas em bancos de germoplasma podem ser classificadas em três grupos de acordo com os respectivos P_{50} : a) sementes ortodoxas de vida curta ($P_{50} < 25$ anos), b) sementes ortodoxas de vida média ($30 < P_{50} < 70$ anos) e c) sementes ortodoxas

de vida longa $P_{50} > 75$ anos. Com base nessa classificação, três espécies analisadas podem ser consideradas ortodoxas de vida curta (*C. harpophylla*, *C. labiata* e *C. mossiae*), 12 espécies seriam ortodoxas intermediárias (*Cattleya alvaroana*, *C. alvaroana*, *C. amethystoglossa*, *C. blumenscheinii*, *C. briegeri*, *C. cernua*, *C. endsfeldzii*, *C. hoehnei*, *C. jongheana*, *C. lucasiana*, *C. nobilior*, *C. purpurata*, *C. tenuis*, *C. tigrina* e *C. warscewiczii*) e 16 seriam ortodoxas de vida longa (*C. angereri*, *C. brevicaulis*, *C. caulescens*, *C. cinnabarina*, *C. granulosa*, *C. harrisoniana*, *C. hegeriana*, *C. intermedia*, *C. pumila*, *C. rupestris*, *C. sanguiloba*, *C. schilleriana*, *C. tenebrosa*, *C. walkeriana* e *C. warneri*). As espécies da América Central, *Laelia anceps* e *Guarianthe bowringiana* – cuja classificação foi recentemente alterada para *L. anceps* e *G. bowringiana*, respectivamente – seriam consideradas como ortodoxas de vida curta, uma vez que a média dos dados referentes aos dois lotes de *G. bowringiana* foi de 24,5 anos (Figura 3.3). Todavia, se for considerado apenas o dado referente ao lote 202 de *G. bowringiana*, a espécie passa a ser classificada como ortodoxa de vida média, indicando que a qualidade inicial do lote pode afetar fortemente os resultados. A variação nos valores da longevidade para uma espécie pode ser grande e provavelmente resulta de controles genéticos do programa de maturação das sementes, bem como de condições ambientais distintas durante o crescimento e pós-colheita (WALTERS; HILL; WHEELER, 2005).

FIGURA 3.3 - Valores de P_{50} calculados para 36 amostras de sementes de orquídeas do gênero *Cattleya*. A- Sementes de vida longa; B- Sementes de vida média; C- Sementes de vida curta.



3.5 Conclusões

A realização do teste de tetrazólio permitiu concluir que o armazenamento a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ mostrou-se eficaz para quase todas as amostras de sementes analisadas, com média de longevidade 83,6 anos. A exceção foi *Cattleya harpophylla* que apresentou P_{50} de apenas 4,5 anos.

REFERÊNCIAS

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

ANDREOLI, C. Simplificação da equação de viabilidade para predizer a longevidade de sementes de milho e soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, n.9, p.911-917, 2004.

ARDITTI, J.; GHANI, A.K.A. Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. **New Phytologist**, v. 145, p. 367-421, 2000.

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

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Instrução normativa n.6, de 23 de setembro de 2008. Lista Oficial das Espécies da Flora Ameaçada de Extinção (Anexo I) e Lista Oficial da Flora Brasileira com Deficiências de Dados. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 24 set. 2008. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/estruturas/ascom_boletins/_arquivos/83_19092008034949.pdf>. Acesso em: 16 jan. 2015.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Portaria n.443, de 17 de dezembro de 2014. Lista Nacional Oficial de Espécies da Flora Ameaçadas de Extinção. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 18 dez. 2014. Disponível em: <<http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?data=18/12/2014&jornal=1&pagina=110&totalArquivos=144>>. Acesso em: 10 out. 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 2009.

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

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

CHAVES, M.M.F.; USBERTI, R. Previsão da longevidade de sementes de faveiro (*Dimorphandra mollis* Benth.). **Revista Brasileira de Botânica**, v.26, n.4, p.557-564, 2003.

CONSEMA. Resolução CONSEMA - 51 Lista Oficial das Espécies da Flora Ameaçadas de Extinção do Estado de Santa Catarina. **Diário Oficial**. Florianópolis, SC, 23 dez. 2014. p. 19. Disponível em: http://imprensaoficial.com.br/PortalIO/DO/BuscaDO2001Documento_11_4.aspx?link=/2004/executivo%20secao%20i/setembro/22/Pag_0026.pdf&pagina=26&data=22/09/2004&caderno=Executivo I. Acesso em: 15 mar. 2015.

COPAM. Deliberação COPAM, no. 85. Lista das Espécies Ameaçadas de Extinção da Flora do Estado de Minas Gerais. **Diário Oficial**. Belo horizonte, MG, 21 out.

1997. Disponível em: <<http://www.siam.mg.gov.br/sla/download.pdf?idNorma=5483>>. Acesso em: 10 out. 2016.

CNCFLORA. **Cattleya in Lista Vermelha da flora brasileira** versão 2012.2 Centro Nacional de Conservação da Flora. Disponível em <<http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Cattleya>>. Acesso em 10 outubro 2016.

ELLIS, R.H. The meaning of viability. In: DICKIE, J.B.; LININGTON, S.H.; WILLIAMS, J.T. (Eds). **Seed management techniques for genebanks**: a report of a workshop. Rome: International Board for Plant Genetic Resources, 294p. 1984.

ELLIS, R.H.; ROBERTS, E.H. Improved equations for the prediction of seed longevity. **Annals of Botany**, v. 4, n.45, p. 13-30, 1980.

ELLIS, R. H.; HONG, T. D.; ROBERT, E. H. An intermediate category of seed storage behavior? **Journal Experimental Botany**, Lancaster, v. 41, p. 167-174, 1990.

EWART, J.A. **On the longevity of seeds**. Proceedings of the Royal Society of Victoria, v.1, p.2-210, 1908.

FINNEY, D.J. **Probit Analysis**. Cambridge, England: Cambridge University Press, 1952.

FRANÇA NETO, J.B.; KRZYZANOWSKI, F.C.; COSTA, N.P. **O teste de tetrazólio em sementes de soja**. Londrina: EMBRAPA-CNPSo, 1998. 72 p.

FORZZA, R.C. et al. **Angiospermas in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2013. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB128482>>. Acesso em: 01 Jul. 2014.

HARRINGTON, J.F. Seed storage and longevity. In: KOZLOWSKI, T.T. (ed.). **Seed Biology**. v. 3. New York: Academic, 1972. p.145-241.

HAY, F. **The Seed Viability Equations**: the normal distribution and probits. Millenium Seed Bank Project Kew. December, 2004. Disponível em: <<http://data.kew.org/sid/viability/SeedViabilityEquationsFHDDec04.pdf>> Acesso em: 09 set. 2016.

HAY, F.R; MEAD, A.; BLOOMBERG, M. Modelling seed germination in response to continuous variables: use and limitations of probit analysis and alternative approaches. **Seed Science Research**, v. 24, p. 165–186, 2014.

HOSOMI, S.T. et al. Pre-conditioning *Cattleya* seeds to improve the efficacy of the tetrazolium test for viability. **Seed Science and Technology**, v. 13, p.178-189, 2011.

HOSOMI, S.T. et al. Improved assessment of viability and germination of *Cattleya* (Orchidaceae) seeds following storage. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 48, p. 127–136, 2012.

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

KRZYŻANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J. B. **Vigor de Sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999.

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

MACHADO NETO, N.B.; CUSTÓDIO, C.C. A medium for non-commercial sowing of orchid seed. **Selbyana**, v. 26, n. 1-2, p. 316-317, 2005a.

MACHADO-NETO, N.B.; CUSTÓDIO, C.C. Orchid conservation through seed banking: ins and outs. **Selbyana**, v. 26, n. 1-2, p. 229-235, 2005b.

McDONALD, M.B. Seed quality assessment. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 8, p. 265-275, 1998.

NEWTON, R; HAY, F.; PROBERT, R. **Protocol for comparative seed longevity testing**. Technical Information Sheet_01. Ardingly: Millennium Seed Bank Partnership, 2014.

POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente**. 2. ed. Brasília: AGIPLAN, 1985. 289p.

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.

ROBERTS, E.H. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science and Technology**, v.1, n.4, p. 449-514, 1973.

SEATON, P.T. et al. Ex situ conservation of orchids in a warming world. **Botanical Review**. v. 76, p. 193–203, 2010.

SEATON, P. T.; PRITCHARD, H.W. **Life in the Freezer: Orchid seed banking for the future**. **Orchids**, v. 77, p. 762–773, 2008.

SEATON, P.T.; PRITCHARD, H.W. Orchid Seed for Sustainable Use: A model for future seed banking activities. **Lankesteriana**, v. 11, n. 3, p. 349-353, 2011.

SEMA. Decreto no. 52.109. Lista da Flora Ameaçada de Extinção do Rio Grande do Sul. **Diário Oficial**. Porto Alegre, RS, 02 dez. 2014. Disponível em: <<http://www.fzb.rs.gov.br/upload/20141222103647doe.pdf> >. Acesso em: 15 out. 2016.

SMA. Resolução SMA - 57 Lista Oficial das Espécies da Flora do Estado de São Paulo Ameaçadas de Extinção. **Diário Oficial**. São Paulo, SP, 05 jun. 2016. p. 69-

71. Disponível em: <http://www.ambiente.sp.gov.br/wp-content/uploads/2016/06/pg_0073.pdf>. Acesso em: 12 out. 2016.

SIMONELLI, M.; FRAGA, C. N. organizadores. **Espécies da flora ameaçadas de extinção no estado do Espírito Santo**. Vitória: Ipema, 2007.

SINÍCIO, R. et al. Equacionamento da qualidade inicial de sementes de milho e soja para aplicação no modelo de probit. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, n. 1, p.122-130, 2009.

SOARES, V.B.; COELHO, G.L.V. Safety study of an experimental apparatus for extraction with supercritical CO₂. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 29, n. 03, p. 677-682, 2012.

WALTERS, C.; HILL, L.M; WHEELER, L.J. Dying while Dry: Kinetics and Mechanisms of Deterioration in Desiccated Organisms. **Integrative and Comparative Biology**, v. 45, p. 751–758, 2005.

4. CAPÍTULO IV: DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA CARDEAL PARA GERMINAÇÃO ASSIMBIÓTICA DE SEMENTES DE *Cattleya*.

RESUMO – As sementes apresentam capacidade germinativa em limites bem definidos de temperatura, característicos para cada espécie. A resposta da germinação à temperatura foi classificada e resumida em três temperaturas cardeais: mínima, ótima e máxima, sendo sua determinação de interesse ecofisiológico. A temperatura ótima propicia uma porcentagem de germinação máxima em menor tempo, enquanto temperaturas máximas e mínimas são pontos em que as taxas de germinação são muito baixas. O trabalho objetivou determinar as temperaturas cardeais para a germinação das sementes de doze espécies de orquídeas do gênero *Cattleya*: *C. purpurata*, *C. walkeriana*, *C. warneri*, *C. labiata*, *C. amethystoglossa*, *C. loddigesii*, *C. brevicaulis*, *C. jongheana*, *C. schilleriana*, *C. tigrina*, *C. tenebrosa* e *C. intermedia*. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Unoeste. A germinação assimbiótica foi realizada em meio de cultura MS e, em seguida, as sementes foram incubadas nas temperaturas constantes de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 °C, com fotoperíodo de 16 horas. A melhor temperatura para a germinação assimbiótica das espécies *C. purpurata*, *C. loddigesii* e *C. warneri* é de 25 °C. Para *C. amethystoglossa*, *C. jongheana*, *C. tigrina* e *C. tenebrosa*, a melhor temperatura situa-se entre 20 e 25 °C. Para *C. walkeriana*, *C. labiata*, *C. brevicaulis*, *C. schilleriana* e *C. intermedia* encontra-se entre 25 e 30 °C. Nestas faixas de temperatura obtêm-se os maiores valores de germinação acumulada, os menores tempos médios e melhores valores de sincronismo. Sementes submetidas à germinação nas temperaturas de 5 e 10 °C apresentaram-se viáveis. Já a germinação a 35, 40 e 45° C não ocorreu e ainda levou os embriões à morte.

Palavras-chave: Meio de cultura MS. Orchidaceae. Tempo médio de germinação.

CARDINAL TEMPERATURE DETERMINATION FOR ASSIMBIOTIC GERMINATION OF ORCHID SEEDS

ABSTRACT – Seeds exhibit germination capability in well-defined temperature limits, proper for each species. The germination response to temperature was classified and summarized in three cardinal temperatures: minimum, optimum and maximum, and it is of ecophysiological interest their determination. The optimum temperature provides a maximum germination rate in less time, while germination rates are very low at maximum and minimum temperatures. The purpose of this study was to determine the cardinal temperatures for seed germination of twelve orchid species of the genus *Cattleya*: *C. purpurata*, *C. walkeriana*, *C. warneri*, *C. labiata*, *C. amethystoglossa*, *C. loddigesii*, *C. brevicaulis*, *C. jongheana*, *C. schilleriana*, *C. tigrina*, *C. tenebrosa* e *C. intermedia*. The experiments were conducted at Plant Tissue Culture Laboratory at Unoeste. The assimbiotic germination was performed on MS medium before seeds were incubated at constant temperatures of 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 and 45 °C, with a photoperiod of 16 hours. The best temperatures for assimbiotic germination for the analyzed species were: 25°C for *C. purpurata*, *C. loddigesii* and *C. warneri*; between 20 and 25 °C for *C. amethystoglossa*, *C. jongheana*, *C. tigrina* and *C. tenebrosa*; for *C. walkeriana*, *C. labiate*, *C. brevicaulis*, *C. schilleriana* and *C. intermedia* between 25 and 30 °C. In these temperature ranges the highest values of accumulated germination, the best average times and values of synchronism were obtained. Seeds germinated at 5 and 10 °C exhibited viability. Germination conducted at 35, 40 and 45 °C did not occur and still led the embryos to death.

Key words: *Cattleya*. Orchidaceae. Germination average time.

4.1 Introdução

A temperatura é um importante fator na germinação das sementes, chegando a ser considerado o principal fator ambiental que controla a germinação em um substrato úmido (DEEN; HUNT; SWANTON, 1998); por este motivo as sementes apresentam capacidade germinativa em limites bem definidos de temperatura, característicos para cada espécie (BEWLEY; BLACK, 2013). A resposta à temperatura foi classificada e resumida em três temperaturas cardeais: mínima, ótima e máxima sendo, portanto, de interesse ecofisiológico sua determinação (GRUNDY; MEAD, 2000; ALVARADO; BRADFORD, 2002; LEBLANC et al., 2003). A temperatura ótima propicia uma porcentagem de germinação máxima em menor tempo, enquanto temperaturas máximas e mínimas são pontos em que as taxas de germinação são muito baixas (MAYER; POLJAKOFF-MAYBER, 1989). As temperaturas máximas aumentam a velocidade de germinação, mas somente as sementes mais vigorosas conseguem germinar, determinando assim uma redução na porcentagem de germinação. Temperaturas mínimas reduzem a velocidade de germinação e alteram a uniformidade da emergência, talvez devido ao aumento do tempo de exposição das sementes ao ataque de patógenos (CARVALHO; NAKAGAWA, 2012).

Como a temperatura de germinação está relacionada às condições ambientais mais favoráveis ao estabelecimento e ao desenvolvimento das plântulas (THOMPSON, 1977; STECKEL; SPRAGUEL; STOLLER, 2004; ANDRADE et al., 2006), é de se esperar que as espécies com diferentes distribuições geográficas e ecológicas produzam sementes com variações quanto ao requerimento térmico para a germinação (CASTRO; BRADFORD; HILHORST, 2004).

A influência da temperatura na germinação se dá especialmente por alterar a velocidade de absorção de água e modificar as velocidades das reações químicas que irão acionar o desdobramento, o transporte de reservas e a ressíntese de substâncias para a plântula (ROMAN et al., 1999). Logo, é responsável não somente pela velocidade de germinação como também pela porcentagem final de germinação (CARVALHO; BORGHETTI; BUCKERIDGE, 2001; MEDEIROS-SILVA; RODRIGUES; AGUIAR, 2002; SOCOLOWSKI; TAKAKI, 2004).

Segundo Labouriau (1983) os efeitos da temperatura podem ser avaliados a partir de mudanças ocasionadas na porcentagem, velocidade e frequência relativa ao longo do tempo. Com relação às frequências de germinação, sabe-se que o processo germinativo de sementes individuais nunca é perfeitamente sincronizado e, então, as frequências devem ter uma certa distribuição ao longo do tempo de incubação isotérmica.

O Brasil tem uma grande biodiversidade vegetal, com um número de espécies terrestres bem conhecidas maior que os outros países do mundo (PIMM et al., 2010). Considerando-se o número de espécies da flora mundial entre 250.000 (FORZZA et al., 2013) até a possibilidade de 300.000 (COWAN et al., 2006) o Brasil apresenta aproximadamente 32.200 espécies, o que corresponde a cerca de 10,7-12,9% de toda a biodiversidade mundial (FORZZA et al., 2013; COWAN et al., 2006). Esse fato pode ser explicado pela variedade de ambientes como a Floresta Equatorial, a Floresta Tropical úmida costeira (Mata Atlântica), os cerrados – com ambiente mais seco – os campos rupestres e diversos outros biomas. O Brasil tem também um grande número de espécies vegetais ameaçadas, em torno de 472 com risco de extinção, integrando a lista vermelha e 1047 com falta de dados, segundo o Ministério do Meio Ambiente (BRASIL, 2014).

As orquídeas (Família Orchidaceae) representam o segundo maior grupo de plantas entre as Angiospermas, com mais de 26.000 espécies distribuídas em cerca de 736 gêneros (CHASE et. al, 2015); excetuando-se os híbridos artificiais, que no Brasil incluem 200 gêneros e 2.500 espécies (FORZZA et al., 2013). Essas plantas são utilizadas principalmente para ornamentação e por esse motivo vêm sendo intensamente exploradas, o que, juntamente com a intensa degradação de seus habitats, tem resultado na extinção localizada de populações nativas (KOOPOWITZ, 2001).

As espécies de orquídeas do gênero *Cattleya*, estão distribuídas em duas grandes regiões. A primeira é nas montanhas do Brasil, ocupando a região paralela à costa oriental do país. A segunda compreende os Andes, estendendo-se no sentido Leste através da Venezuela até Trinidad e no sentido Norte através da América Central até o Sul do México. A maior parte das espécies encontra-se em habitats montanhosos e prefere o frio para se desenvolver, embora algumas tenham se adaptado ao calor e às condições de umidade das planícies (WITHNER, 1988).

A maioria dessas orquídeas é epífita, mas os hábitos rupícola e terrícola ocorrem também. Acontecem nos domínios fitogeográficos brasileiros da Amazônia, Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica. Segundo Fowlie (1977), os centros de origem de *Cattleya* seriam a região costeira entre o Litoral Norte Paulista e Sul do Rio de Janeiro e também o Vale do Paraíba e regiões montanhosas da Serra da Mantiqueira e Serra dos Órgãos. Uma grande dispersão seguida de eventos de vicariância e especiação teria ocorrido durante as glaciações do quaternário recente. Durante a época de máxima expansão da vegetação florestal, teria havido uma grande área de habitats de "brejos litorâneos" desde a região de Boracéia, São Paulo, passando pelo Rio de Janeiro, Espírito Santo e Bahia e penetrando pelos vales do Rio São Francisco e Rio Doce. Presume-se que, nestas áreas, *C. bicolor* e outras espécies bifolioladas tenham sofrido uma dispersão massiva. Com o retrocesso das geleiras nas regiões temperadas, o clima foi se tornando mais quente e a planície costeira se tornou bastante estreita. As áreas do interior teriam se fragmentado e muitas espécies se adaptado às matas de galeria no interior do país.

Segundo Van den Berg (2014) *Cattleya* é um gênero neotropical composto por 114 espécies. Para Barros et al. (2015), 105 espécies deste gênero fazem parte da lista da flora brasileira, sendo 98 endêmicas no país. Os cinco estados brasileiros que apresentam o maior número descrito de orquídeas do gênero *Cattleya* são Minas Gerais com 53 espécies, Espírito Santo com 27, Rio de Janeiro com 24 espécies, Bahia e São Paulo com 14 espécies cada. O domínio fitogeográfico Mata Atlântica abriga 51 espécies, o Cerrado possui 36 espécies, a Caatinga comporta 9 espécies e Amazônia com 8 espécies do gênero (BARROS et al., 2015)

As sementes de orquídeas se apresentam muito numerosas, com tamanho e peso reduzidos (LEE et al., 2008). Elas consistem em pequenos embriões globulares, com uma pequena quantidade de células, mas com alguma reserva lipídica. O tamanho das sementes pode variar de 0,28 a 10,09 mm de comprimento, e de 0,39 ug a 1,79 mg de peso (YAM et al., 2009). Essas características tornam bastante indicado o estabelecimento de bancos genéticos através do armazenamento de sementes, tanto para espécies silvestres, quanto para espécies já melhoradas. Desta forma, a avaliação da qualidade fisiológica das sementes é importante para auxiliar uma rápida tomada de decisão quanto ao uso ou descarte de lotes destinados ao armazenamento (HOSOMI et al., 2011, 2012).

Na maioria das orquídeas, as sementes germinam em entre 6 e 40 °C, e a temperatura para a maior porcentagem de germinação *in vitro* é normalmente entre 20 e 25 °C (ARDITTI; ERNST 1984). Segundo Swarts e Dixon (2009) e Seaton et al. (2010) a família Orchidaceae enfrenta um futuro incerto em relação aos impactos da mudança do clima e da perda de habitats, pois a elevação da temperatura provocada pelas mudanças climáticas poderá ter um efeito direto na germinação e, conseqüentemente, no estabelecimento destas espécies. De acordo com os modelos propostos por Marengo (2006), elevações de temperatura do ar entre 1,5 e 5,0 °C aumentariam a deficiência hídrica, afetando consideravelmente as atividades dependentes de chuva, reduzindo a germinação de sementes e comprometendo seu desenvolvimento. Por outro lado, a ocorrência de eventos extremos pode resultar em maiores incidências de chuvas torrenciais e enchentes, promovendo severos impactos socioambientais, com aumento na frequência de dias secos consecutivos, ondas de calor e veranicos. Desta forma, o estudo da dependência da temperatura na germinação de uma espécie pode fornecer dados importantes para o entendimento de sua distribuição geográfica (LABOURIAU, 1983).

Para Carvalho e Nakagawa (2012), é essencial ressaltar que os efeitos da temperatura na germinação são complexos, pois podem afetar cada estágio do processo germinativo de diferentes maneiras, além de estar relacionados aos processos bioquímicos aos quais as sementes são sujeitas. Assim, o conhecimento do efeito da temperatura na germinação, bem como estudos visando uma correlação entre temperatura e ambiente pode tornar possível prever quais grupos de plantas estariam mais adaptados às mudanças climáticas.

4.2 Objetivos

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de diferentes temperaturas na germinação das sementes e determinar as temperaturas mínima, ótima e máxima, tempo médio da germinação e velocidade de germinação de doze espécies de orquídeas do gênero *Cattleya*: *C. purpurata*, *C. walkeriana*, *C. warneri*, *C. labiata*, *C. amethystoglossa*, *C. loddigesii*, *C. brevicaulis*, *C. jongheana*, *C. schilleriana*, *C. tigrina*, *C. tenebrosa* e *C. intermedia*.

4.3 Material e Métodos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Células e Tecidos Vegetais da Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE – Presidente Prudente – SP), utilizando sementes de orquídeas coletadas de frutos de doze espécies de orquídeas do gênero *Cattleya*, provenientes do Orquidário Aurora (Taciba - SP).

As cápsulas de *C. purpurata*, *C. walkeriana*, *C. warneri*, *C. labiata*, *C. amethystoglossa*, *C. loddigesii*, *C. brevicaulis*, *C. jongheana*, *C. schilleriana*, *C. tigrina*, *C. tenebrosa* e *C. intermedia*, foram coletadas e acondicionadas em envelope de papel, onde foram mantidas em temperatura ambiente até a deiscência dos frutos. As sementes obtidas de cada planta foram armazenadas em envelope de papel sobre sílica gel a 4 °C, com 6,5% de umidade (BRASIL, 2009) até o início dos testes de viabilidade. Posteriormente, o armazenamento se deu em microtubos mantidos em frascos de vidro hermeticamente fechados, contendo sílica gel, armazenados em freezer a -18 °C.

Foram utilizados doze lotes de sementes de espécies brasileiras de orquídeas, presentes em diferentes listas de espécies ameaçadas de extinção, com exceção de *C. brevicaulis* e *C. loddigesii* que constam como avaliadas (NE). Dez espécies analisadas no presente trabalho integram a última lista de espécies ameaçadas da flora brasileira (CNCFLORA, 2012; BRASIL, 2014). Três espécies apresentam o status “em perigo” (EN) – *C. jongheana*, *C. schilleriana*, *C. tenebrosa* – seis possuem o status “vulnerável” (VU) – *C. purpurata*, *C. walkeriana*, *C. warneri*, *C. labiata*, *C. tigrina* e *C. intermedia* possui status “quase ameaçada” (NT). No ano de 2008 apenas quatro espécies do gênero integravam a lista oficial das espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção (BRASIL, 2008), sendo duas com status “criticamente em perigo” (CR) – *C. schilleriana* e *C. tenebrosa* – duas com status “em perigo” (EN) – *C. labiata* e *C. jongheana*. Por um lado houve um aumento no número de espécies na lista vermelha brasileira na lista atualizada, por outro houve melhora do status de três espécies, pois *C. schilleriana* e *C. tenebrosa* passaram de “criticamente em perigo” para “em perigo” e *C. labiata* passou de “em perigo” para “vulnerável”.

Cinco estados brasileiros tem publicadas listas oficiais de espécies da flora ameaçadas de extinção. Na lista oficial do estado do Rio Grande do Sul, três espécies do gênero *Cattleya* estão presentes: *C. purpurata* e *C. tigrina* como “em perigo” e *C. intermedia* como “vulnerável” (SEMA-RS, 2014). Na lista oficial do estado de Santa Catarina tem apenas a *C. purpurata* com status “em perigo” (CONSEMA-SC, 2014). Na lista oficial do estado de São Paulo, duas espécies estão presentes: *C. purpurata* e *C. tigrina* como “vulnerável” (SMA-SP, 2016). Na lista oficial do estado de Minas Gerais, três espécies são descritas como “criticamente em perigo”: *C. warneri*, *C. amethystoglossa* e *C. jongheana* (COPAM-MG, 1997). Na lista oficial do estado do Espírito Santo, quatro espécies estão presentes: *C. labiata*, *C. schilleriana* e *C. tenebrosa* como “criticamente em perigo” e *C. lodigesii* como “vulnerável” (SIMONELLI; FRAGA, 2007).

Os lotes de sementes foram coletados a partir de abril de 2013, e *C. brevicaulis*, *C. jongheana*, *C. schilleriana*, *C. tigrina*, *C. tenebrosa* e *C. intermedia* não passaram pelo armazenamento a -18 °C por terem sido coletadas próximo a data do experimento. De modo geral, todas as espécies estão presentes no bioma Mata Atlântica, sendo *C. walkeriana*, *C. brevicaulis* e *C. jongheana* também são encontradas em áreas de Cerrado e *C. labiata* e *C. amethystoglossa* são encontradas no bioma Caatinga. Quanto ao hábito, *C. brevicaulis* é rupícola e as demais são epífitas, podendo *C. walkeriana*, *C. warneri*, *C. labiata*, *C. amethystoglossa*, *C. tigrina*, *C. tenebrosa* e *C. intermedia* apresentarem-se rupícolas também (Tabela 4.1).

TABELA 4.1 - Relação dos lotes de sementes das espécies de orquídeas utilizados no estudo de temperatura cardeal, data de coleta dos frutos, distribuição geográfica e identificação dos biomas e hábitos, grau de ameaça (EX- Extinta, EW- Extinta na natureza, CR- Criticamente em perigo, EN- Em perigo, VU-Vulnerável, NT-Quase ameaçada, LC- Menos preocupante, DD- Dados insuficientes, NE-Não avaliada).

No. lote	Espécie	Data de coleta	Distribuição geográfica ¹	Bioma / Hábitos ¹	Grau de ameaça
235	<i>Cattleya purpurata</i>	abr/13	RS, SC, PR, SP, RJ, ES	Mata Atlântica e regiões litorâneas / Epífitas e rupícolas	VU ¹ , EX ² , VU ³ , VU ⁷ CITES II ¹
301	<i>Cattleya walkeriana</i>	nov/13	SP, MS, MT, MG, GO, TO	Mata Atlântica, Cerrado / Epífitas ou rupícola	VU ¹ , CITES II ¹
309	<i>Cattleya warneri</i>	jan/14	MG, RJ, ES, BA	Mata Atlântica / Epífitas	VU ¹ , CR ⁴
314	<i>Cattleya labiata</i>	jan/14	RJ, ES, SE, AL, PE, PB, CE	Mata Atlântica, Caatinga / Epífitas ou rupícola	VU ¹ , EN ⁵ , CR ⁶
320	<i>Cattleya amethystoglossa</i>	jan/14	MG, ES, BA	Mata Atlântica, Caatinga / Epífitas ou rupícola	NT ¹ , CR ⁴
325	<i>Cattleya loddigesii</i>	jan/14	SP, MG, RJ, ES	Mata Atlântica / Epífitas	NE ¹ , VU ⁶
344	<i>Cattleya brevicaulis</i>	jul/14	MG, ES	Cerrado, Mata Atlântica / rupícolas	NE ¹
346	<i>Cattleya jongheana</i>	jul/14	MS, SP, MG, ES	Cerrado, Mata Atlântica / epífitas	EN ¹ , CR ⁴ , EN ⁵ , CITES II ¹
347	<i>Cattleya schilleriana</i>	jul/14	RJ, ES, BA	Mata Atlântica / Epífita	EN ¹ , CR ⁵ , CR ⁶ , CITES II ¹
348	<i>Cattleya tigrina</i>	jul/14	RS, SC, SP, BA, SE, PE	Mata Atlântica / Epífitas ou rupícola	VU ¹ , VU ² , VU ³ , CITES II ¹
349	<i>Cattleya tenebrosa</i>	jul/14	RJ, ES, MG, BA	Mata Atlântica / Epífitas ou rupícola	EN ¹ , CR ⁵ , CR ⁶ , CITES II ¹
350	<i>Cattleya intermedia</i>	jul/14	RS, SC, PR, SP, RJ	Mata Atlântica / Epífitas ou rupícola	VU ¹ , VU ³

¹- CNCFlora. *Cattleya* in Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012.2 Centro Nacional de Conservação da Flora. Disponível em <<http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Cattleya>>. Acesso em 10 outubro 2016.

²- Lista Oficial das Espécies da Flora do Estado de São Paulo Ameaçadas de Extinção (SMA-SP, 2016).

³- Lista Oficial das Espécies da Flora Ameaçadas de Extinção do Estado do Rio Grande do Sul (SEMA-RS, 2014).

⁴- Lista das Espécies Ameaçadas de Extinção da Flora do Estado de Minas Gerais (COPAM-MG, 1997).

⁵- Lista Oficial de Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção (BRASIL, Ministério do Meio Ambiente, 2008).

⁶- Lista das Espécies da Flora Ameaçadas de Extinção no Estado do Espírito Santo (SIMONELLI, M.; FRAGA, 2007).

⁷- Lista Oficial das Espécies da Flora Ameaçadas de Extinção no Estado de Santa Catarina (CONSEMA-SC, 2014).

Para a avaliação da viabilidade das sementes pelo teste de tetrazólio foram aliqüotados em microtubos 10mg de sementes, os quais foram submetidos ao pré-condicionamento através da adição de 1,5mL de solução de sacarose a 10%, por 24 horas. Após este período as sementes foram lavadas duas

vezes em água destilada e adicionou-se a cada amostra 1,5mL de solução de tetrazólio (Cloreto de 2,3,5-Trifenil-Tetrazólio) a 1%, na qual foram mantidas por 24 horas, em banho-maria à temperatura de 40 °C, em ambiente escuro (HOSOMI, 2011).

A metodologia empregada na determinação da viabilidade das sementes baseia-se na utilização de imagens digitalizadas por computador em lugar do microscópio estereoscópico, mais amplamente utilizado. Após o período de incubação de cada amostra, descartou-se 1,0 mL da solução de cada microtubo e o restante foi gotejado em cima de uma placa de vidro posicionada ao lado de uma régua de plástico. As imagens foram digitalizadas em resolução de 3600 dpi com a utilização de um scanner de mesa HP Scanjet G2710. As contagens das sementes foram realizadas na tela do computador e as imagens foram modificadas, quando necessário, com o uso do software Adobe Photoshop® CC 2015, através de ferramentas de ampliação de imagem, definição de contraste e brilho. Foram consideradas viáveis as sementes portadoras de embriões coloridos de vermelho, tendo sido consideradas inviáveis as sementes com coloração branca.

Para a contagem da viabilidade das sementes foram marcados três campos em cada imagem e a viabilidade das sementes foi expressa em porcentagem.

Logo após o período de germinação assimbiótico em meio MS foi realizado o teste de tetrazólio para lotes de sementes de doze espécies: *C. purpurata*, *C. walkeriana*, *C. warneri*, *C. labiata*, *C. amethystoglossa*, *C. loddigesii*, *C. brevicaulis*, *C. jongheana*, *C. schilleriana*, *C. tigrina*, *C. tenebrosa* e *C. intermedia*.

O teste de germinação foi realizado em meio MS adicionado de sacarose (20g.L⁻¹) e ágar (6g.L⁻¹). O pH foi corrigido com NaOH para 5,6 e o meio de cultura autoclavado para posterior distribuição em placas de Petri de 50mm. Previamente à semeadura, 20 mg de cada lote de sementes foram desinfetadas por 10 minutos com DCCA – Dicloroisocianurato de sódio (5g.L⁻¹), com adição de algumas gotas de Tween 80, dentro de seringas em câmara de fluxo laminar (MACHADO NETO; CUSTÓDIO, 2005). Após esse procedimento, as sementes foram lavadas duas vezes com água destilada autoclavada e em seguida 1,0 mL das soluções de sementes foram gotejadas dentro de cada placa de Petri. Estas foram envoltas com filme plástico e transferidas para sala de crescimento a 25° C, câmara BOD (10; 15; 35; 40 e 45 °C), estufas de germinação (20 e 30 °C) ou ainda geladeira

(5 °C), com fotoperíodo de 16 horas por 49 dias. As temperaturas de todos os ambientes foram monitoradas diariamente na primeira semana e a iluminação foi medida também na primeira semana com piranômetro (LI-190SA, LI-COR, USA).

Para a contagem da germinação das sementes foram marcados três campos em cada placa, os quais foram fotografados com câmera digital Sony DSC-P10 acoplada manualmente na lente ocular do microscópio estereoscópio. Todos os campos das placas foram fotografados a cada sete dias, mantidos sempre na mesma posição. As imagens foram analisadas no computador e modificadas, quando necessário, com o uso do software Adobe Photoshop® CC 2015, através de ferramentas de ampliação de imagem, definição de contraste e brilho. As sementes que apresentarem embriões expandidos e massa celular de coloração verde (estágio 1) foram consideradas germinadas, segundo as definições de Seaton e Hailes (1989). Para cada lote de sementes foram semeadas três placas de Petri com três campos de contagem em cada placa.

A viabilidade das sementes de orquídea, verificada pelo teste de Tetrazólio e taxa germinação, foi expressa em porcentagem. O Índice de Velocidade de Germinação para o lote de sementes foi calculado conforme Maguire (1962). Os cálculos de porcentagem, tempo médio, velocidade e frequência relativa de germinação foram realizados conforme fórmulas citadas por Labouriau e Valadares (1976):

- Porcentagem de germinação:

$$G = \left(\frac{N}{A}\right) \times 100 \text{ onde: } \mathbf{G} = \text{porcentagem de germinação; } \mathbf{N} = \text{número de sementes germinadas; } \mathbf{A} = \text{número total de sementes colocadas para germinar}$$

- Tempo médio de germinação:

$$t = \frac{(\sum ni.ti)}{\sum ni} \text{ onde: } \mathbf{t} = \text{tempo médio de incubação; } \mathbf{ni} = \text{número de sementes germinadas por dia; } \mathbf{ti} = \text{tempo de incubação (dias)}$$

- Velocidade média de germinação:

$$V = \frac{1}{t} \text{ onde: } \mathbf{V} = \text{velocidade média de germinação; } \mathbf{t} = \text{tempo médio de germinação}$$

- Frequência relativa de germinação:

$Fr = \frac{ni}{\sum ni}$ onde: **Fr** = frequência relativa de germinação; **ni** = número de sementes germinadas por dia; $\sum ni$ = número total de sementes germinadas

- O Índice de sincronismo informacional da distribuição de frequências relativas da germinação foi calculado de acordo com Labouriau e Pacheco (1978):

$E = -\sum fi \times \log_2 fi$ onde: **E** = sincronismo informacional; **fi** = frequência relativa de germinação; \log_2 = logaritmo na base 2

4.4 Resultados e Discussão

A temperatura em que a germinação ocorre é um fator que possui importante influência sobre o processo, tanto sob o aspecto da germinação total como da velocidade de germinação. A temperatura influencia tanto a velocidade de absorção de água como as reações bioquímicas que determinam todo o processo germinativo (NASCIMENTO, 2005).

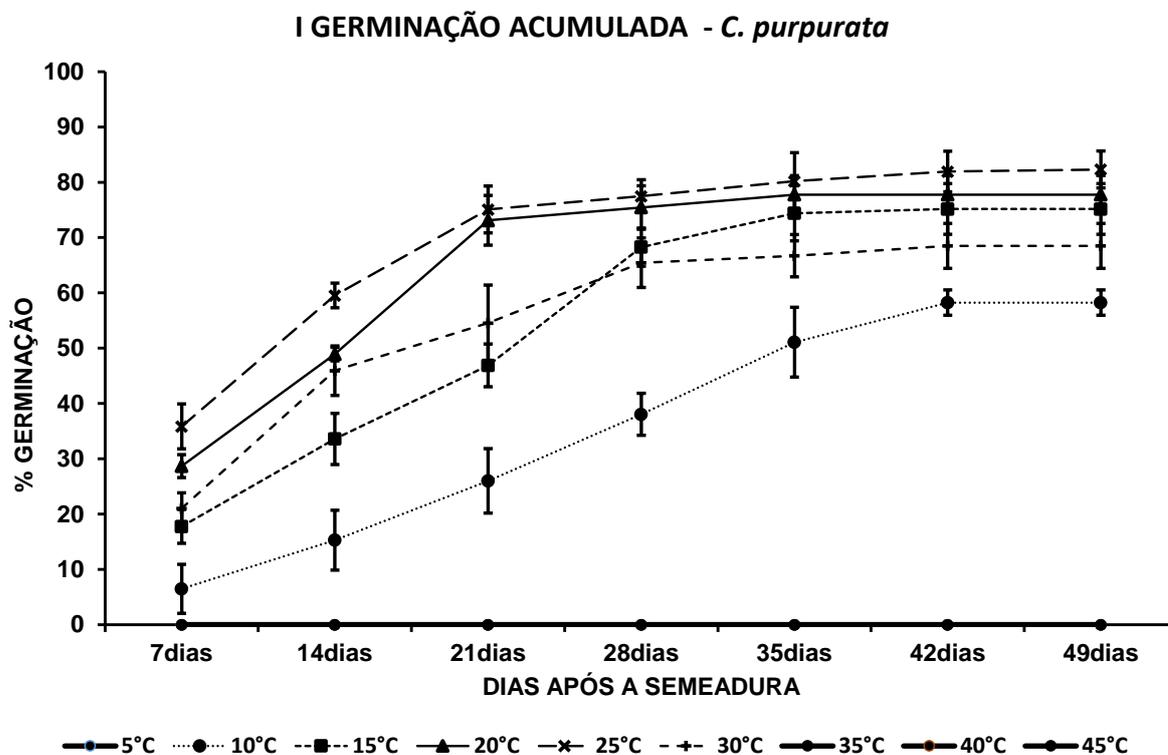
As sementes de *C. purpurata*, *C. warneri*, *C. amethystoglossa*, *C. brevicaulis*, *C. schilleriana*, *C. tigrina*, *C. tenebrosa* e *C. intermedia* apresentaram os maiores valores de germinação quando mantidas na temperatura de 25 °C – respectivamente 82,3%, 61,7%, 97,1%, 99,4%, 98,3%, 96,1%, 92,4% e 97,2% de germinação total. Já as sementes de *C. labiata* exibiram o maior valor de germinação (34,0%) na temperatura de 20°C e *C. walkeriana* apresentou o valor máximo (98,5%) na temperatura de 30°C. Para as sementes de *C. loddigesii* as temperaturas de 15, 20, 25 e 30 °C favoreceram a germinação de 100,0% e as sementes de *C. jongheana* exibiram 100,0% de germinação a 15 e a 25 °C (Figura 4.1).

Na Figura 4.1 observa-se que as temperaturas de 20, 25 e 30 °C permitiram maiores valores de germinação em menores tempos. Já nas temperaturas de 5, 35, 40 e 45 °C a germinação não ocorreu.

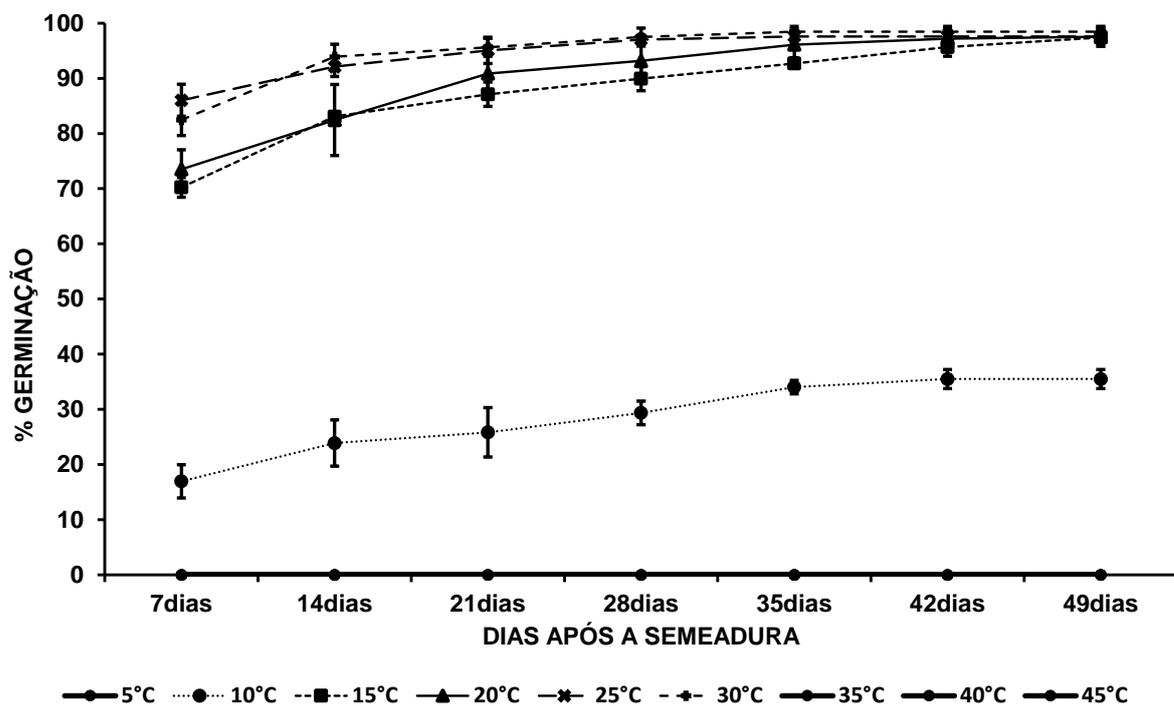
Na temperatura de 10 °C ocorreu germinação apenas para os lotes de *C. purpurata*, *C. walkeriana*, *C. brevicaulis*, *C. jongheana*, *C. schilleriana* e *C. tenebrosa* com os valores de germinação total de 58,5%, 35,5%, 76,6%, 41,8%, 58,5% e 9,7% respectivamente.

As sementes de *C. labiata* e *C. warneri* apresentaram os menores valores de germinação total, de 34,0% e 61,7% respectivamente, apesar de terem demonstrado uma viabilidade alta pelo teste de tetrazólio, de 96,1% e 93,3%, respectivamente (Tabela 4.16). Os lotes dessas sementes mantiveram-se conservados a -18 °C por seis meses (Tabela 4.1). É possível que as sementes desses lotes tenham sofrido danos ao serem desinfetadas com solução de hipoclorito de sódio antes da germinação assimbiótica, favorecendo os baixos valores de germinação (CUSTÓDIO et al., 2016).

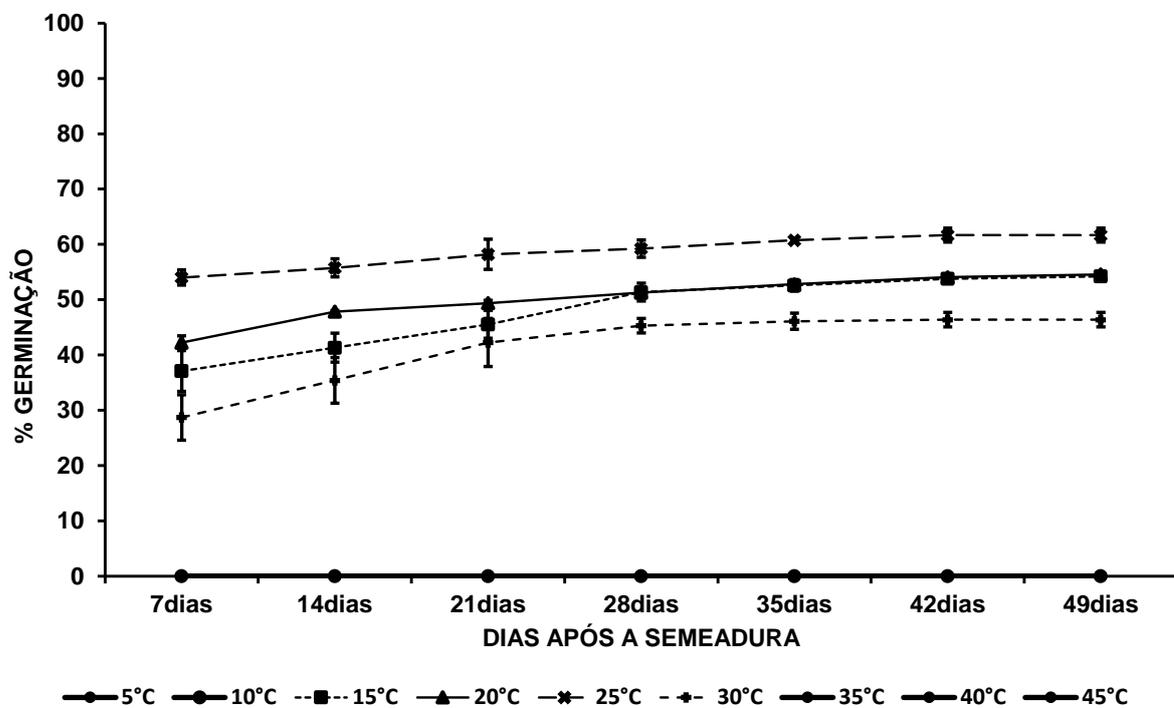
FIGURA 4.1 - Porcentagem de germinação assimbiótica das amostras de sementes de I- *Cattleya purpurata*, II- *Cattleya walkeriana*, III- *Cattleya warneri*, IV- *Cattleya labiata*, V- *Cattleya amethystoglossa*, VI- *Cattleya lodigesii*, VII- *Cattleya brevicaulis*, VIII- *Cattleya jongheana*, IX- *Cattleya schilleriana*, X- *Cattleya tigrina*, XI- *Cattleya tenebrosa* e XII- *Cattleya intermedia* semeadas em meio MS em diferentes temperaturas (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 °C).

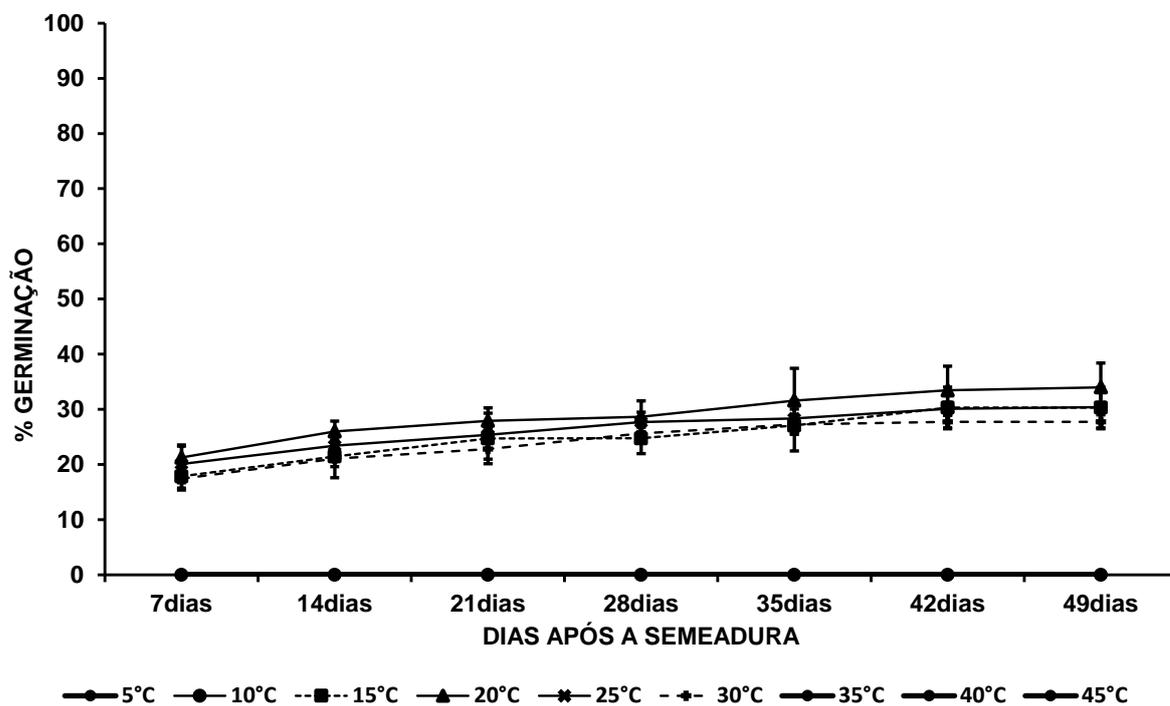
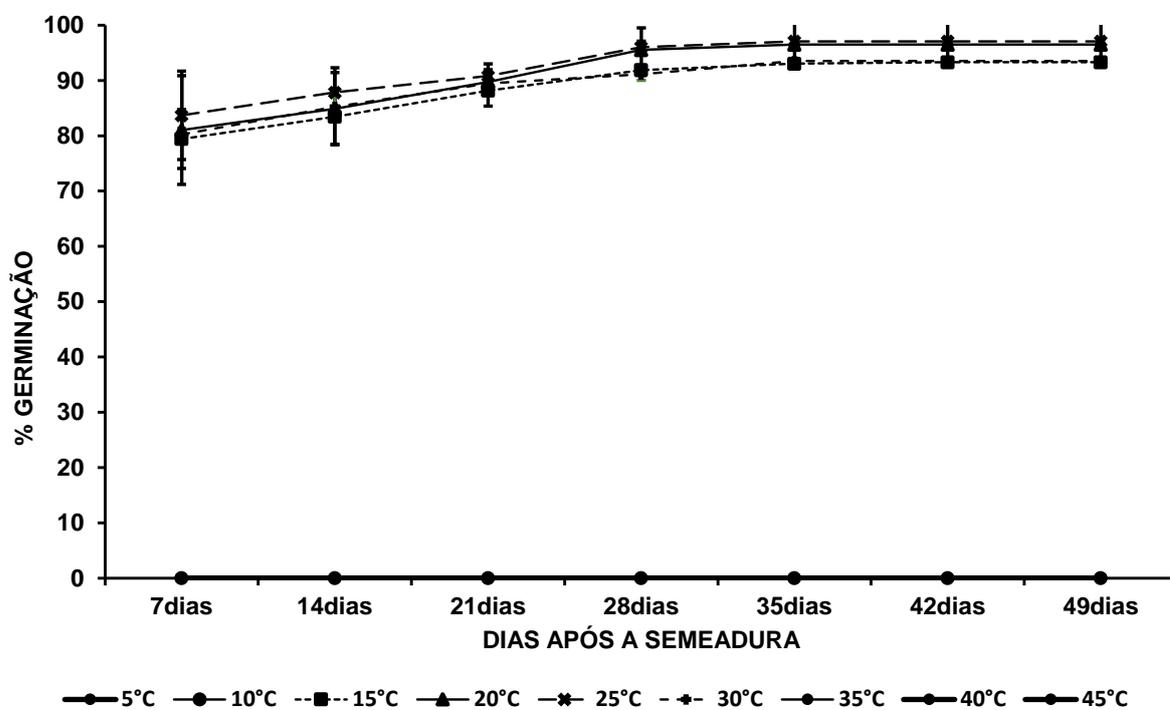


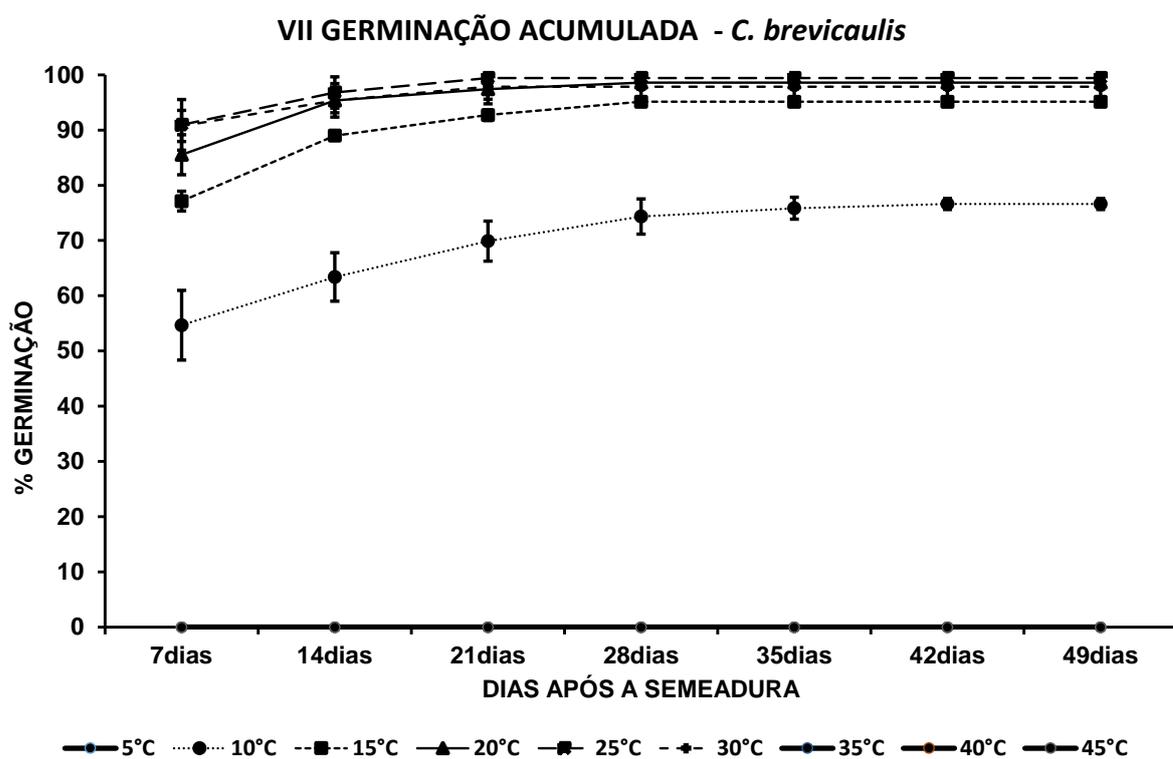
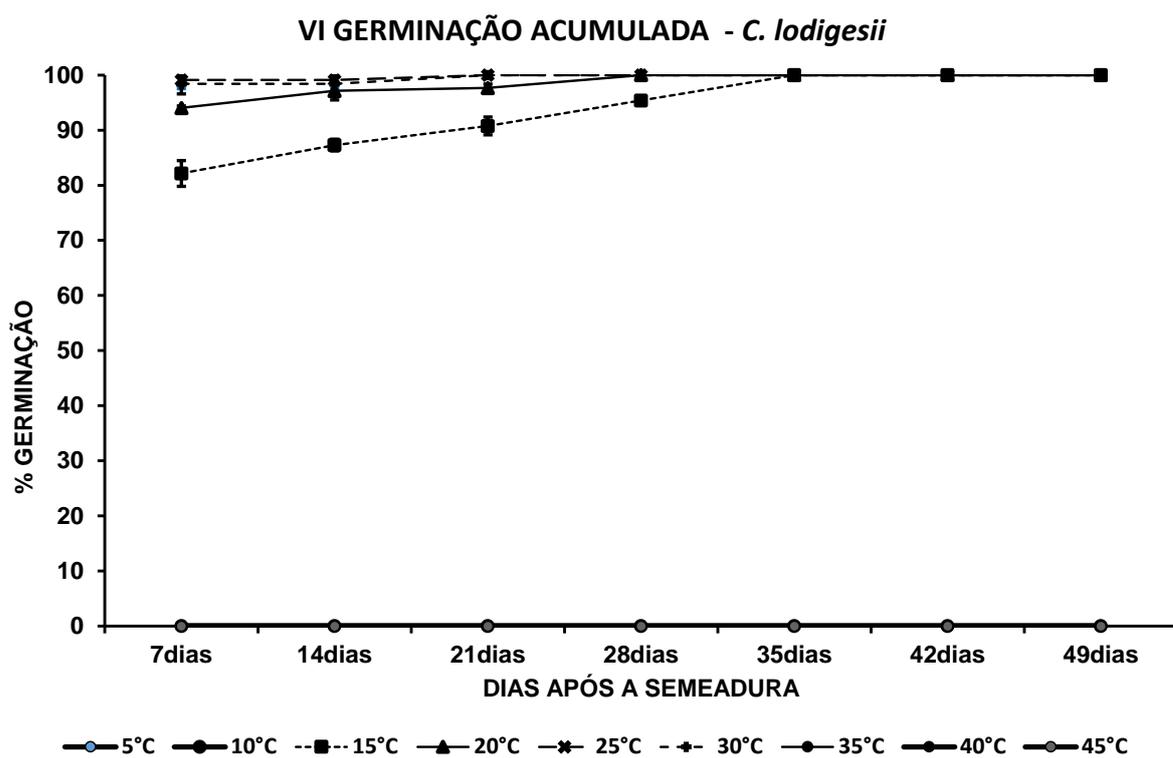
II GERMINAÇÃO ACUMULADA - *C. walkeriana*

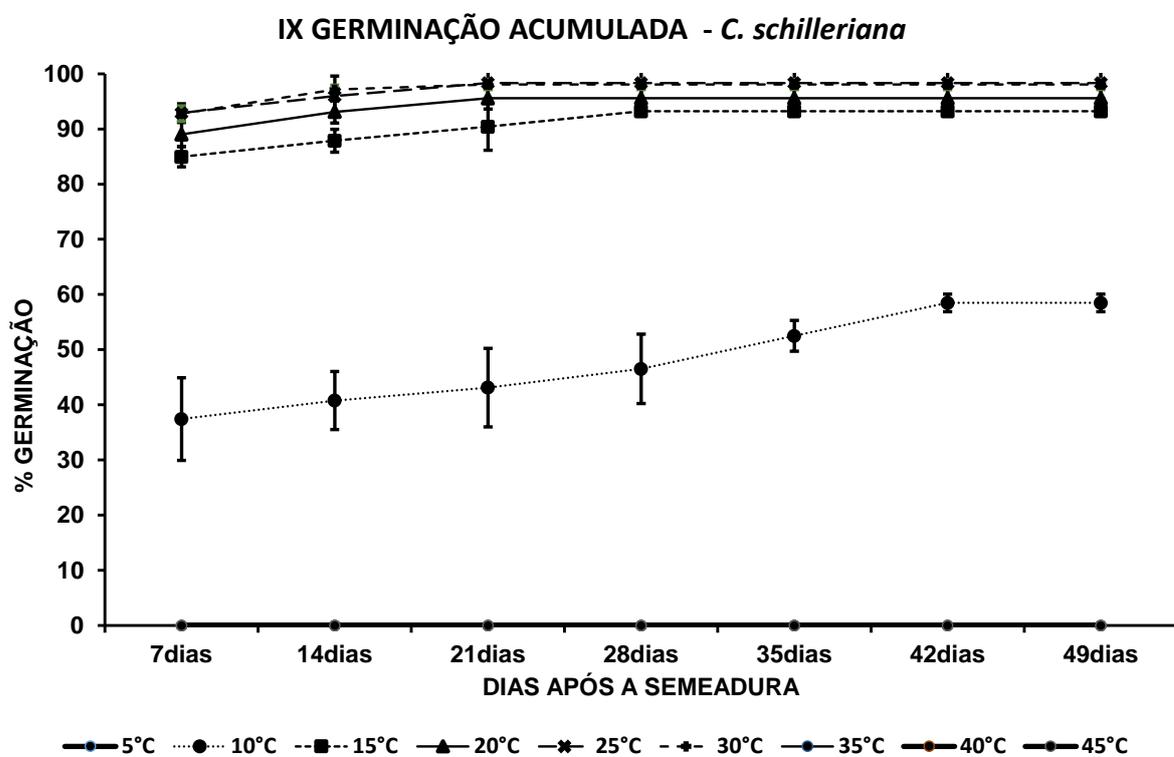
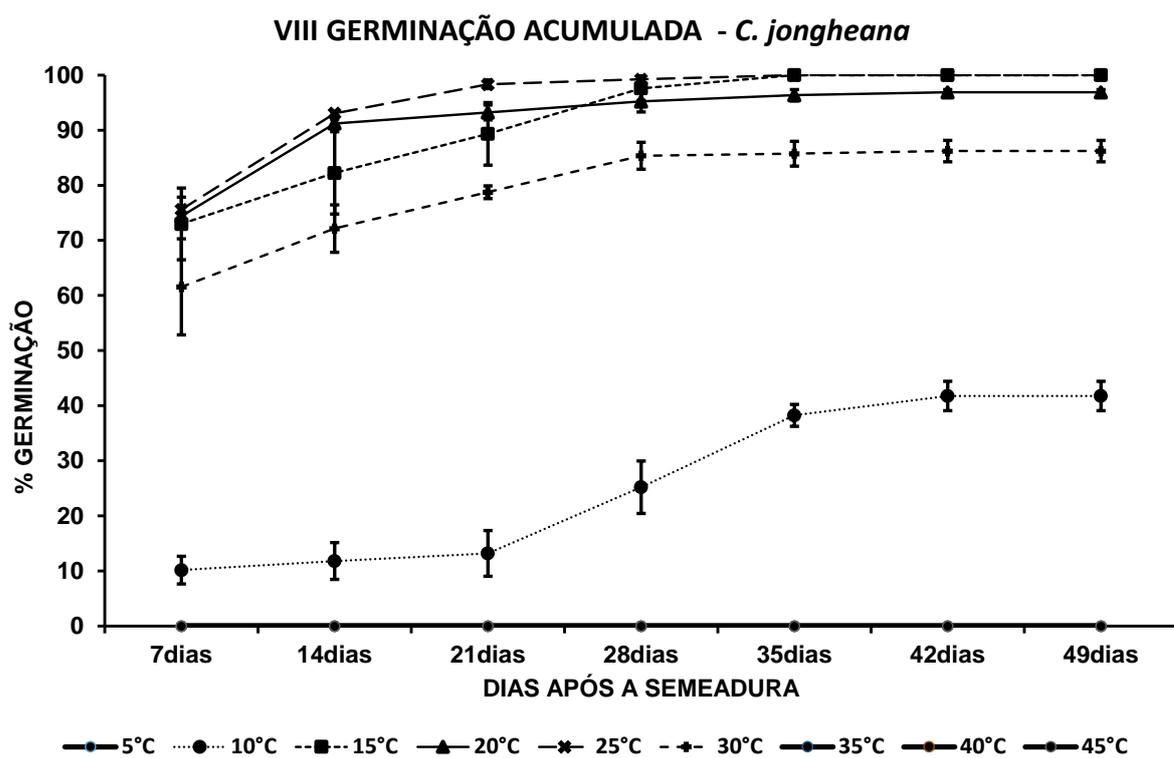


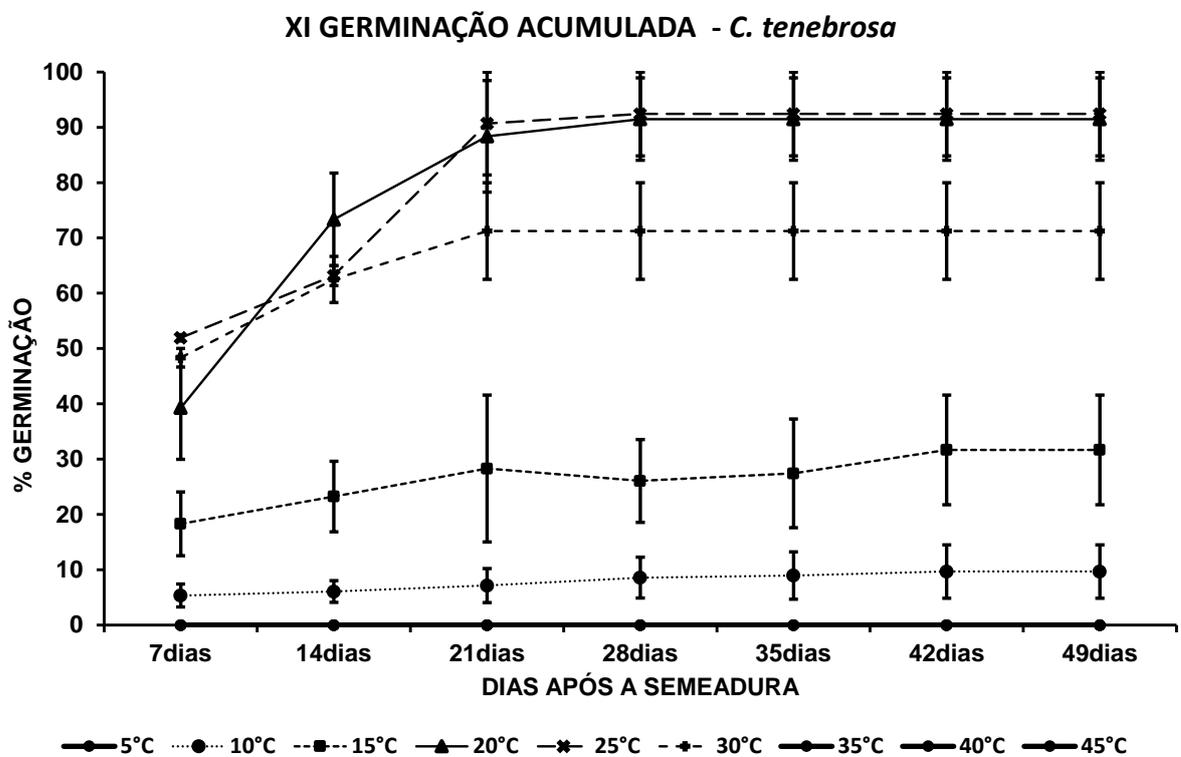
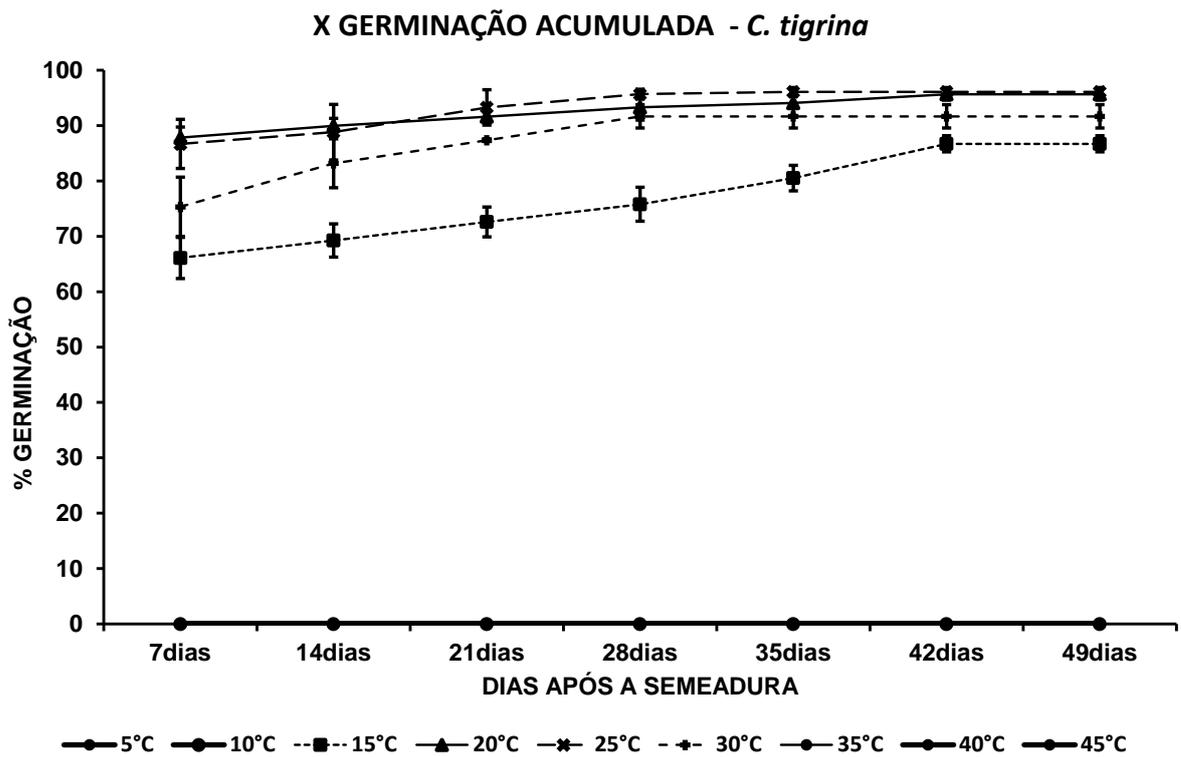
III GERMINAÇÃO ACUMULADA - *C. warneri*

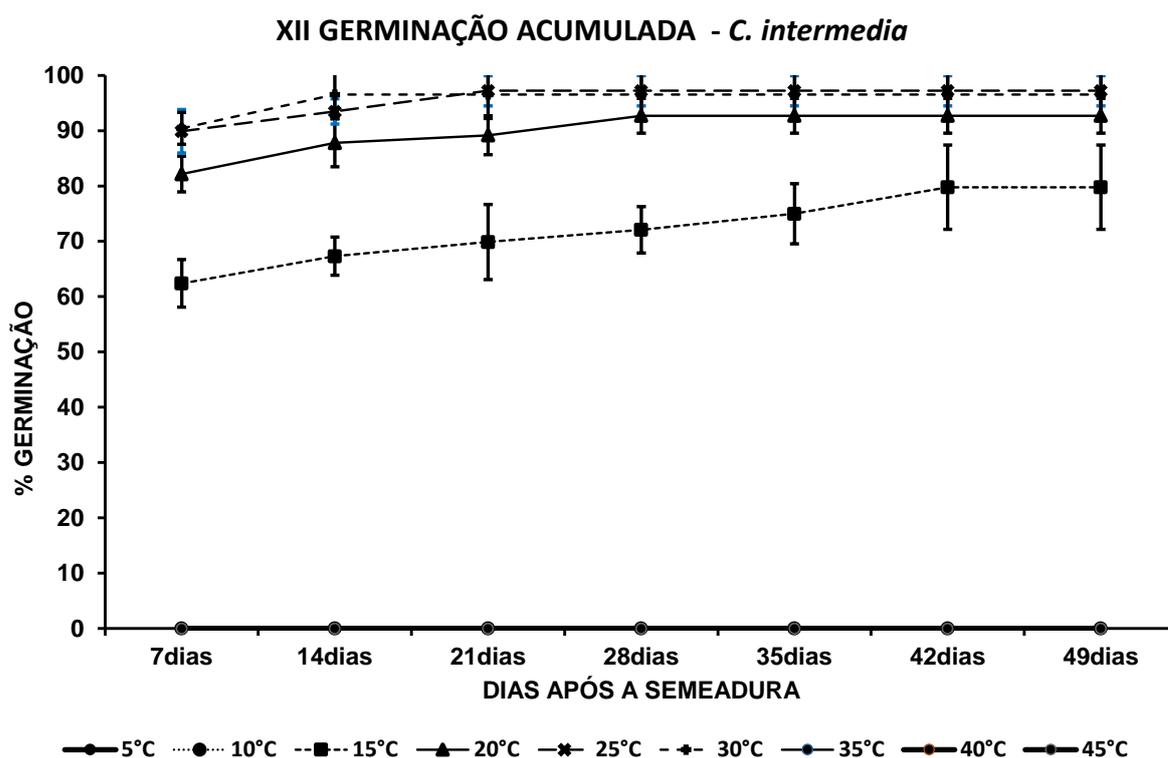


IV GERMINAÇÃO ACUMULADA - *C. labiata*V GERMINAÇÃO ACUMULADA - *C. amethysstoglossa*









Na Tabela 4.2 estão descritos os valores de IVG para os doze lotes de sementes de orquídeas submetidos à germinação assimbiótica em meio de cultura MS. As temperaturas de germinação de 10 e 15 °C apresentam os valores mais baixos de IVG, dentre os tratamentos em que ocorreu a germinação das sementes. Já as germinações realizadas nas temperaturas 20, 25 e 30 °C alternam-se como as que exibem os melhores resultados. Para os lotes de sementes de *C. purpurata*, *C. walkeriana*, *C. warneri*, *C. amethystoglossa*, *C. loddigesii*, *C. brevicaulis*, *C. jongheana*, e *C. tenebrosa* o melhor IVG foi obtido a 25 °C. Para *C. labiata* e *C. tigrina*, o maior valor de IVG foi de 20 °C e em *C. schilleriana* e *C. intermedia*, o maior valor de IVG foi a 30 °C. Para Carvalho; Nakagawa (2012) o Índice de Velocidade de Germinação é um dos conceitos mais antigos de vigor de sementes. Lotes de sementes com porcentagens de germinação semelhantes frequentemente mostram diferenças em suas velocidades de germinação, indicando que existem diferenças de vigor entre eles. Este método baseia-se no princípio de que lotes de sementes com maior velocidade de germinação são mais vigorosos, ou seja, há uma relação direta entre a velocidade de germinação e o vigor. No caso dos lotes de sementes de orquídeas analisados, verificou-se que para todos eles os maiores

valores de germinação são iguais aos maiores valores de IVG, que ocorrem nas temperaturas entre 20 e 30 °C.

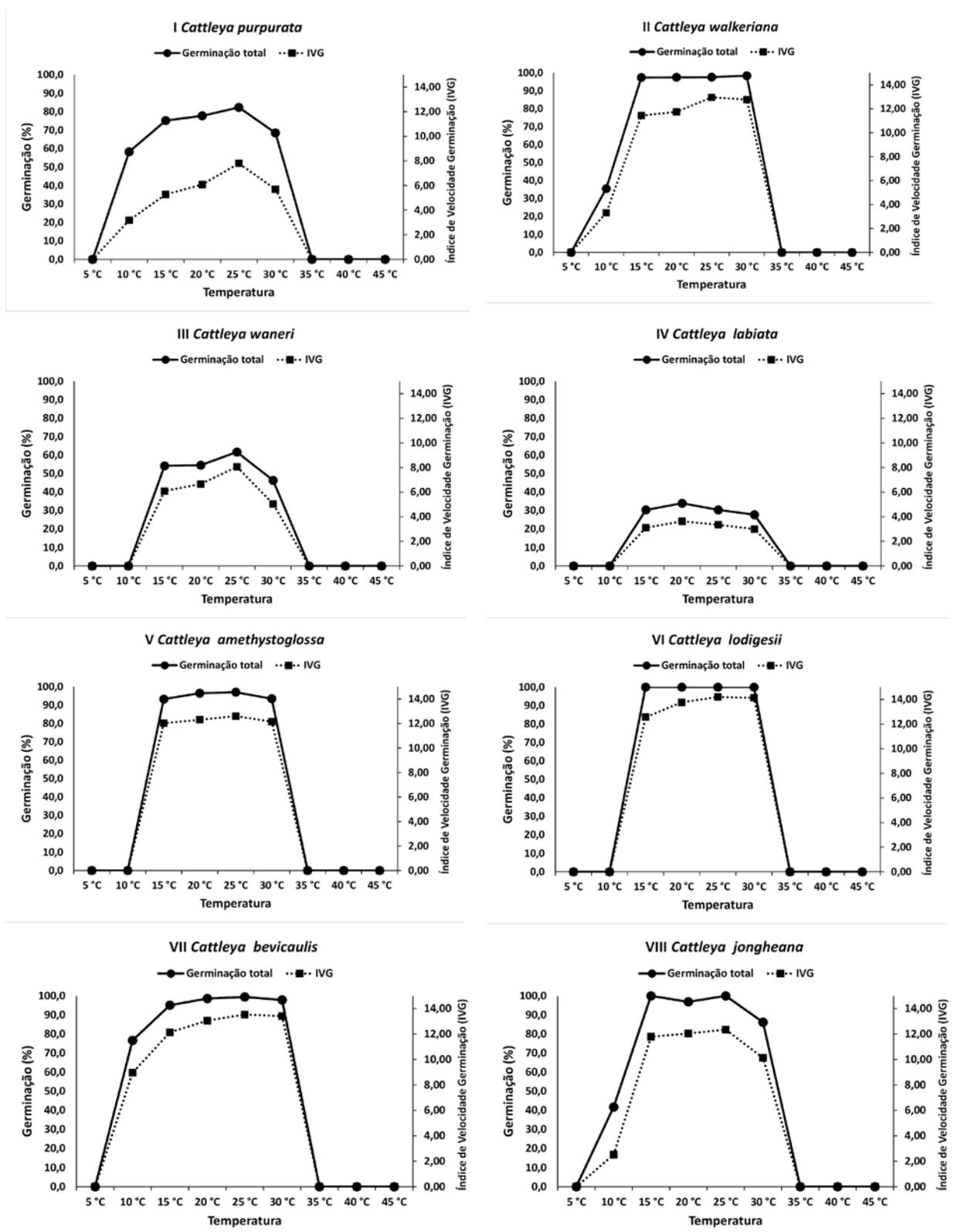
TABELA 4.2 - Valores de IVG-Índice de Velocidade de Germinação calculados a partir da germinação assimbiótica das sementes de orquídeas *C. purpurata*, *C. walkeriana*, *C. warneri*, *C. labiata*, *C. amethystoglossa*, *C. loddigesii*, *C. brevicaulis*, *C. jongheana*, *C. schilleriana*, *C. leopoldii*, *C. tenebrosa* e *C. intermedia* em meio MS em diferentes temperaturas.

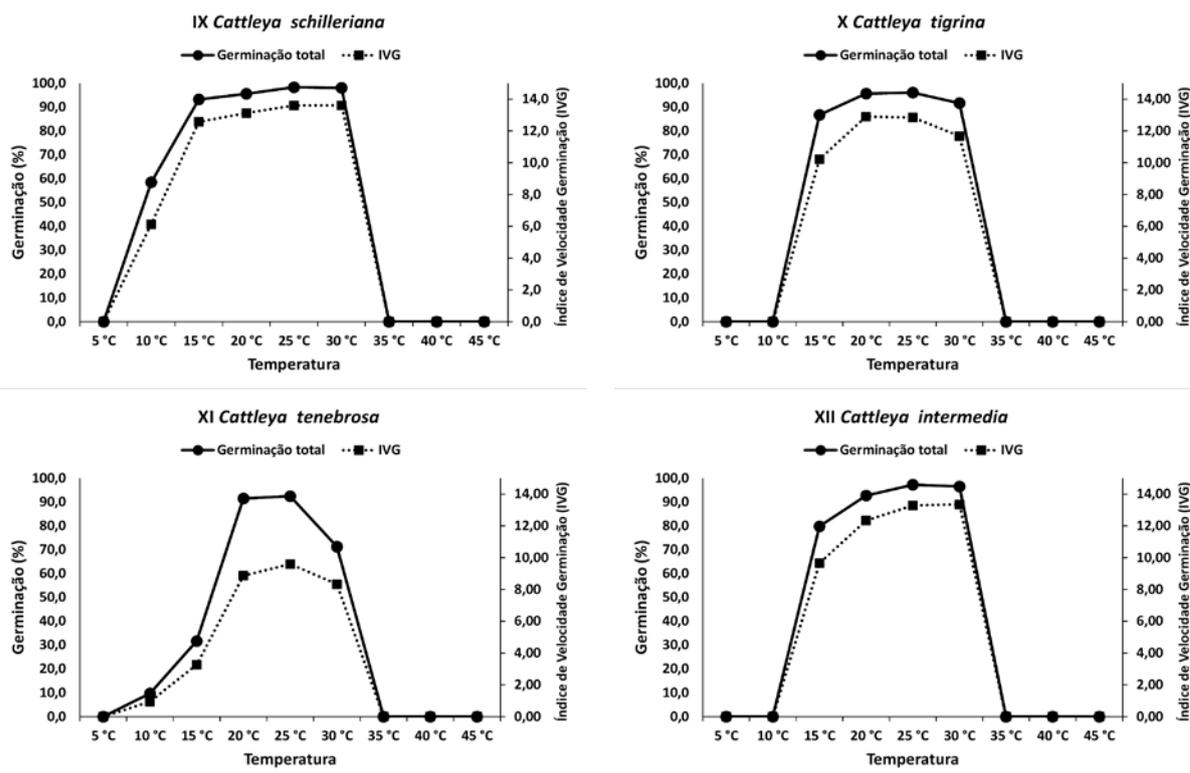
T °C	Índice de Velocidade de Germinação					
	<i>Cattleya purpurata</i>	<i>Cattleya walkeriana</i>	<i>Cattleya warneri</i>	<i>Cattleya labiata</i>	<i>Cattleya amethystoglossa</i>	<i>Cattleya loddigesii</i>
5	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
10	3,19±0,57	3,30±0,36	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
15	5,27±0,36	11,44±0,08	6,08±0,35	3,11±0,39	12,03±0,56	12,56±0,21
20	6,08±0,27	11,74±0,48	6,66±0,10	3,63±0,34	12,32±0,77	13,76±0,07
25	7,79±0,37	12,95±0,22	8,06±0,15	3,35±0,32	12,61±0,69	14,20±0,15
30	5,70±0,12	12,78±0,24	5,04±0,36	2,99±0,23	12,15±0,14	14,13±0,17
35	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
40	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
45	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
	<i>Cattleya brevicaulis</i>	<i>Cattleya jongheana</i>	<i>Cattleya schilleriana</i>	<i>Cattleya tigrina</i>	<i>Cattleya tenebrosa</i>	<i>Cattleya intermedia</i>
5	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
10	8,96±0,62	2,52±0,27	6,13±0,78	0,00±0,00	0,94±0,38	0,00±0,00
15	12,13±0,15	11,79±0,71	12,57±0,25	10,22±0,38	3,27±1,03	9,66±0,19
20	13,06±0,37	12,04±0,02	13,13±0,23	12,90±0,17	8,87±0,46	12,33±0,46
25	13,54±0,38	12,35±0,17	13,60±0,26	12,84±0,49	9,59±0,46	13,28±0,46
30	13,41±0,18	10,12±0,68	13,61±0,13	11,67±0,41	8,33±0,40	13,35±0,50
35	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
40	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
45	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00

Médias ± desvio padrão; T(°C) – temperatura em graus Celsius

Para as sementes das espécies *C. purpurata*, *C. warneri*, *C. amethystoglossa*, *C. brevicaulis*, *C. jongheana*, *C. tigrina* e *C. tenebrosa* os picos de germinação total e IVG ocorrem próximo a 25 °C, decaindo em temperaturas inferiores e superiores a esse valor. O mesmo ocorre para as sementes das espécies *C. walkeriana*, *C. loddigesii*, *C. schilleriana*, e *C. intermedia*, porém os picos situam-se próximo à 30 °C, enquanto para *C. labiata* os maiores valores ocorrem a 20 °C (Figura 4.2).

FIGURA 4.2 - Valores de germinação total e IVG-Índice de Velocidade de Germinação para sementes de orquídeas semeadas em condições assimbióticas no meio MS em diferentes temperaturas: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 °C. I- *C. purpurata*, II- *C. walkeriana*, III- *C. warneri*, IV- *C. labiata*, V- *C. amethystoglossa*, VI- *C. loddigesii*, VII- *C. brevicaulis*, VIII- *C. jongheana*, IX- *C. schilleriana*, X- *C. leopoldii*, XI- *C. tenebrosa* e XII- *C. intermedia*.





O tempo médio de germinação das sementes de *Cattleya purpurata* foi relativamente alto a 10 °C (25,6 dias) e a 15 °C (19,5 dias). Não houve germinação nas temperaturas de 5, 35, 40 e 45 °C (Figura 4.1-I e Tabela 4.2). A 25 °C ocorreram os maiores valores de germinação (82,3%) e menor tempo médio (14,1 dias); nesta temperatura observou-se também o maior desenvolvimento dos protocormos após o 21º dia de semeadura (Figura 4.3). Em relação aos valores de sincronismo – aqueles em que o metabolismo das sementes é maior – os maiores valores foram obtidos nas temperaturas de 10 e 15 °C (Tabela 4.3 e Figura 4.3), entretanto a 10 °C a frequência relativa de germinação apresenta ampla distribuição ao longo do período de germinação.

Cattleya purpurata é uma espécie de orquídea típica de florestas ombrófilas e áreas de restinga da Mata Atlântica, com distribuição nos estados do Rio Grande do Sul até o Espírito Santo (Tabela 4.1). Os maiores valores de germinação ocorreram em temperaturas entre 20 e 30 °C, as mesmas nas quais os protocormos desenvolvem-se melhor, podendo atingir o estágio de plântulas (Figuras 4.2; 4.3 e 4.4).

Para *C. purpurata* as temperaturas cardeais determinadas foram: temperatura mínima de 10 °C com 58,2% de germinação e tempo médio de 25,6 (o maior dentre todos); temperatura ótima de 25 °C, na qual ocorreram os maiores

valores de germinação e tempo médio – 82,3% e 14,1, respectivamente; e temperatura máxima de 30 °C com 68,5% de germinação e 16,1 dias de tempo médio (Figura 4.3)

TABELA 4.3 - Valores de Tempo médio, Velocidade de germinação, U-Sincronismo calculados a partir da germinação assimbiótica das sementes da orquídea *Cattleya purpurata*, em meio MS em diferentes temperaturas.

T (°C)	Tempo Médio	Velocidade	U
5	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
10	25,61±2,25	0,04±0,00	2,46±0,08
15	19,53±1,24	0,05±0,00	2,25±0,06
20	14,64±0,21	0,07±0,00	1,86±0,04
25	14,12±0,52	0,07±0,00	1,91±0,07
30	16,07±0,58	0,06±0,00	2,03±0,05
35	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
40	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
45	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00

Médias ± desvio padrão; T(°C) – temperatura em graus Celsius

FIGURA 4.3 - Frequências relativas de germinação das sementes de *Cattleya purpurata*, semeadas em meio MS em diferentes temperaturas (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 °C). As setas representam o tempo médio de germinação para cada temperatura (Gt– Porcentagem da germinação total, Tm-Tempo médio de germinação e U-Sincronismo na germinação).

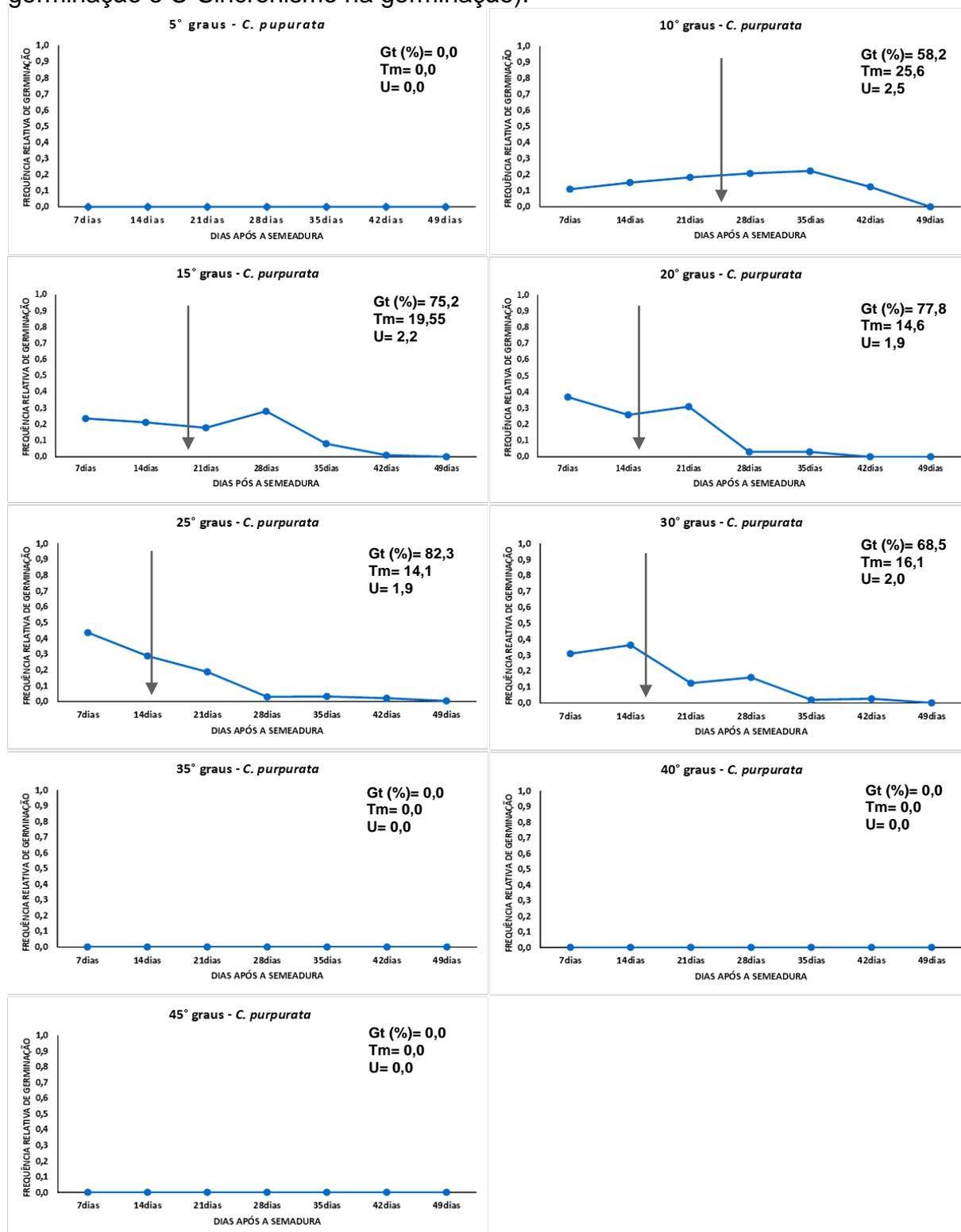


Figura 4.4 - Germinação assimbiótica de sementes de *Cattleya purpurata* em meio MS em diferentes temperaturas (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 °C), 21 dias após a semeadura.

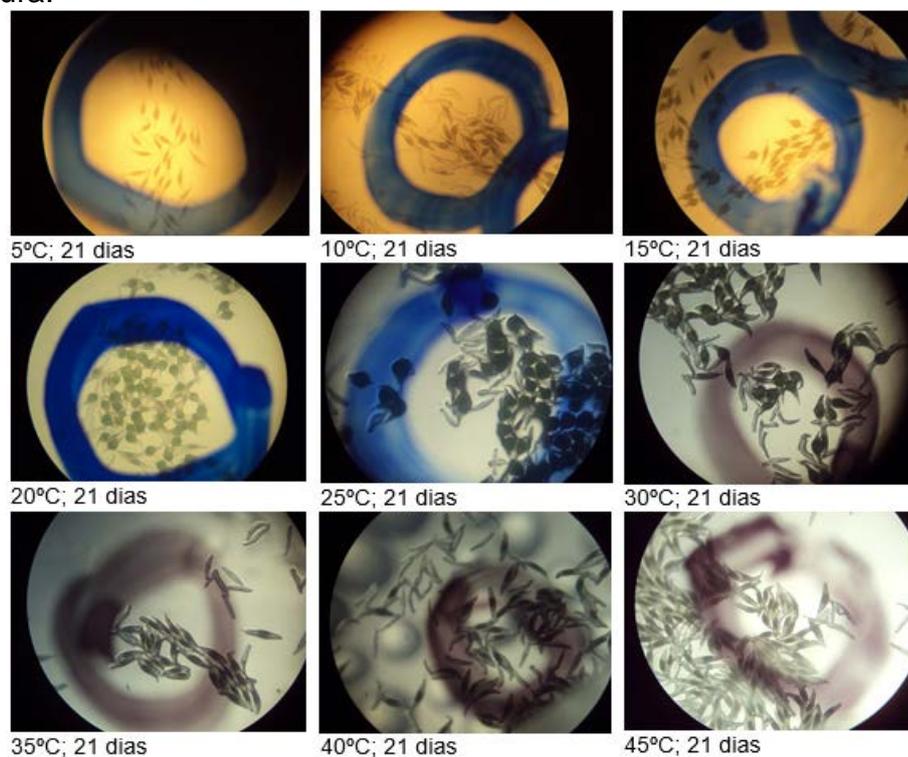
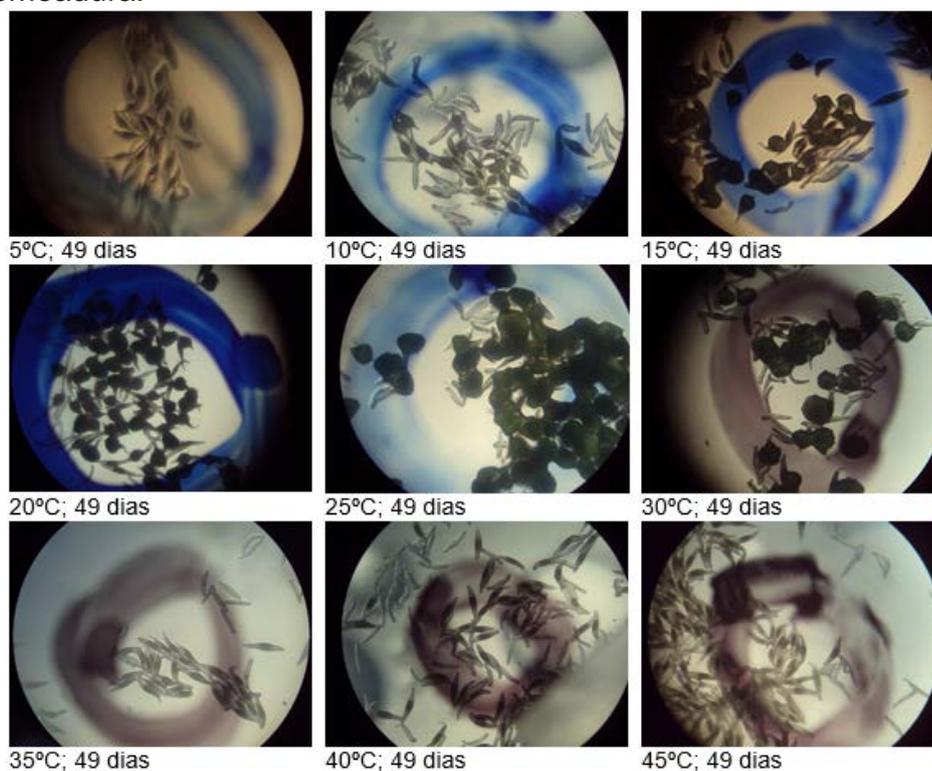


FIGURA 4.5 - Germinação assimbiótica de sementes de *Cattleya purpurata* em meio MS em diferentes temperaturas (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 °C), após 49 dias após a semeadura.



O lote de sementes de *C. walkeriana* apresentou uma variação de tempo médio de germinação entre 8 a 16 dias. Relacionando os valores de germinação acumulada com o tempo médio, velocidade e sincronismo em *C. walkeriana* pode-se afirmar que a temperatura de 25 °C é a melhor para a germinação assimbiótica, uma vez que germinação acumulada foi de 97,6%, (Figura 4.1-II) com o maior valor de IVG, no menor tempo médio (8,4 dias), com velocidade de 0,12 e sincronismo de 0,68. Já a 30 °C, a germinação acumulada foi de 98,5%, porém o tempo médio foi de 8,7 dias e a velocidade 0,11 (Tabela 4.4 e Figura 4.6). A temperatura de 10 °C propiciou uma assimetria na distribuição no período de germinação, com maior tempo médio e distribuição polimodal das frequências. Laboriau e Agudo (1987) atribuíram um significado a este padrão de distribuição, creditando-o à compensação das condições desfavoráveis de temperatura por uma maior distribuição da germinação no tempo (Figura 4.33). Essa irregularidade na germinação é positivamente relatada por Larcher (2000), pois quando em condições naturais, as plântulas emergem em tempos diferentes e parte da progênie evita as condições climáticas mais desfavoráveis e uma herbivoria severa.

A espécie *C. walkeriana* está presente nas fisionomias de vegetação da Mata Atlântica do Interior como a Floresta Estacional Semidecidual e Floresta Estacional Decidual, assim como no bioma Cerrado (Tabela 4.1). Nas Figuras 4.7 e 4.8 observa-se que os protocormos de *C. walkeriana* apresentaram-se bastante desenvolvidos 21 dias após a semeadura na temperatura de 25 °C. Os protocormos apresentaram-se verdes 45 dias após a semeadura nas temperaturas de 15, 20, 25 e 30 °C. Na germinação a 10 °C os protocormos estavam bastante debilitados e nas temperaturas de 5, 35, 40 e 45 °C os embriões não se desenvolveram. As taxas de germinação não permitiram determinar uma única temperatura ótima para *C. walkeriana*, uma vez que não houve diferenças significativas entre os desvios obtidos para os dados referentes às temperaturas de 25 e 30 °C – respectivamente 97,6% e 98,5%. Sendo assim, considerou-se uma faixa de temperatura ótima para a espécie, variando entre 25 e 30 °C. A temperatura mínima considerada foi de 10 °C com uma germinação de 35,4%, já que a 5 °C não houve germinação. Já a temperatura máxima não pôde ser exatamente determinada, uma vez que a temperatura de 30° C compõe a faixa ótima e a 35° C já não houve germinação (Tabela 4.15).

TABELA 4.4 - Valores de Tempo médio, Velocidade de germinação, U-Sincronismo calculados a partir da germinação assimbiótica das sementes da orquídea *Cattleya walkeriana*, em meio MS em diferentes temperaturas.

T (°C)	Tempo Médio	Velocidade	U
5	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
10	16,28±3,35	0,06±0,01	1,98±0,38
15	11,72±0,44	0,09±0,00	1,43±0,02
20	10,72±1,25	0,09±0,01	1,25±0,17
25	8,45±0,32	0,12±0,00	0,68±0,14
30	8,73±0,40	0,11±0,01	0,81±0,11
35	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
40	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
45	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00

Médias ± desvio padrão; T (°C) – temperatura em graus Celsius

FIGURA 4.6 - Frequências relativas de germinação das sementes de *Cattleya walkeriana*, semeadas em meio MS em diferentes temperaturas: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 °C. As setas representam o tempo médio de germinação para cada temperatura (Gt- Porcentagem da germinação total, Tm- Tempo médio de germinação e U- Sincronismo na germinação).

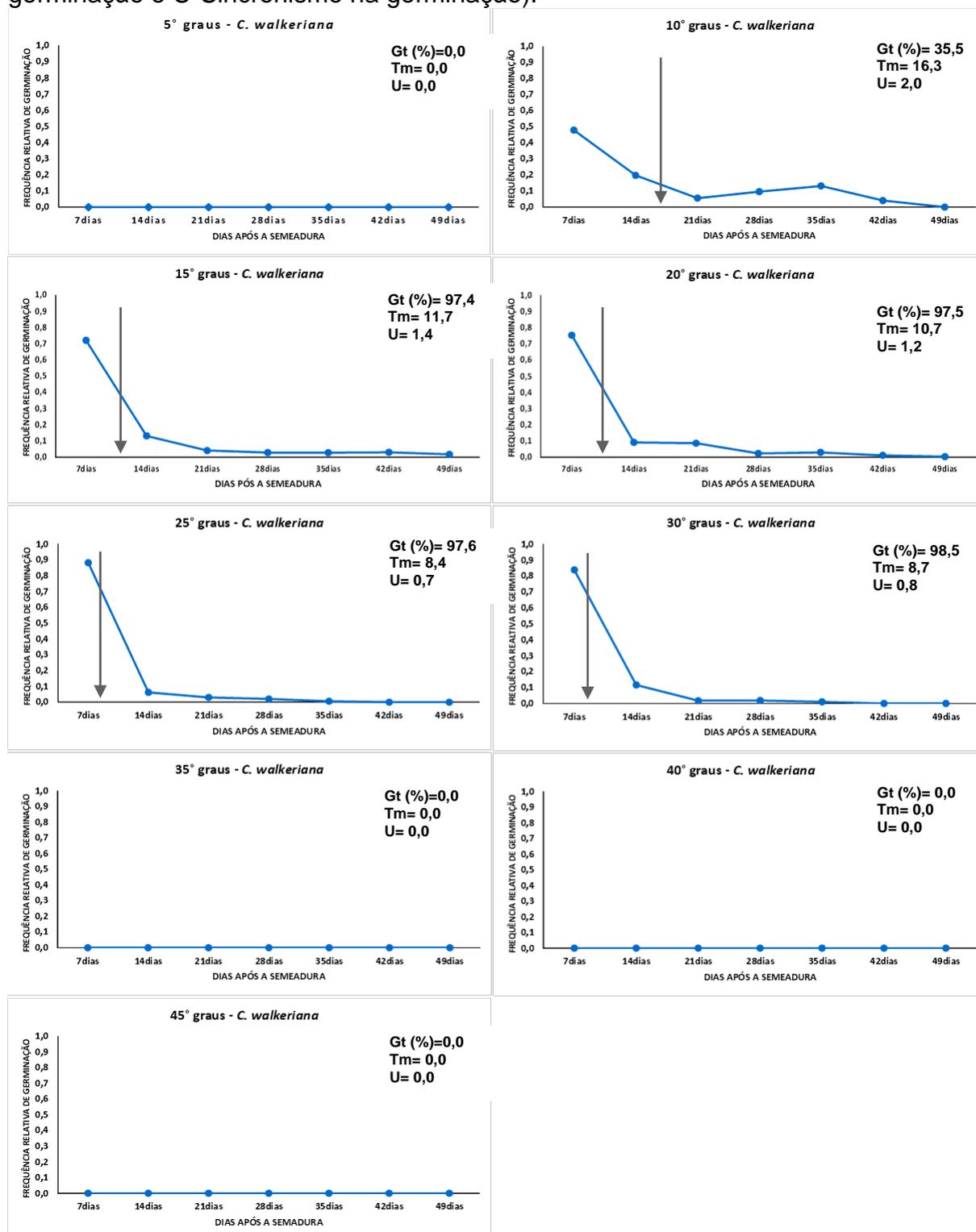


FIGURA 4.7 - Germinação assimbiótica de sementes de *Cattleya walkeriana* em meio MS em diferentes temperaturas (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 °C), 21 dias após a semeadura.

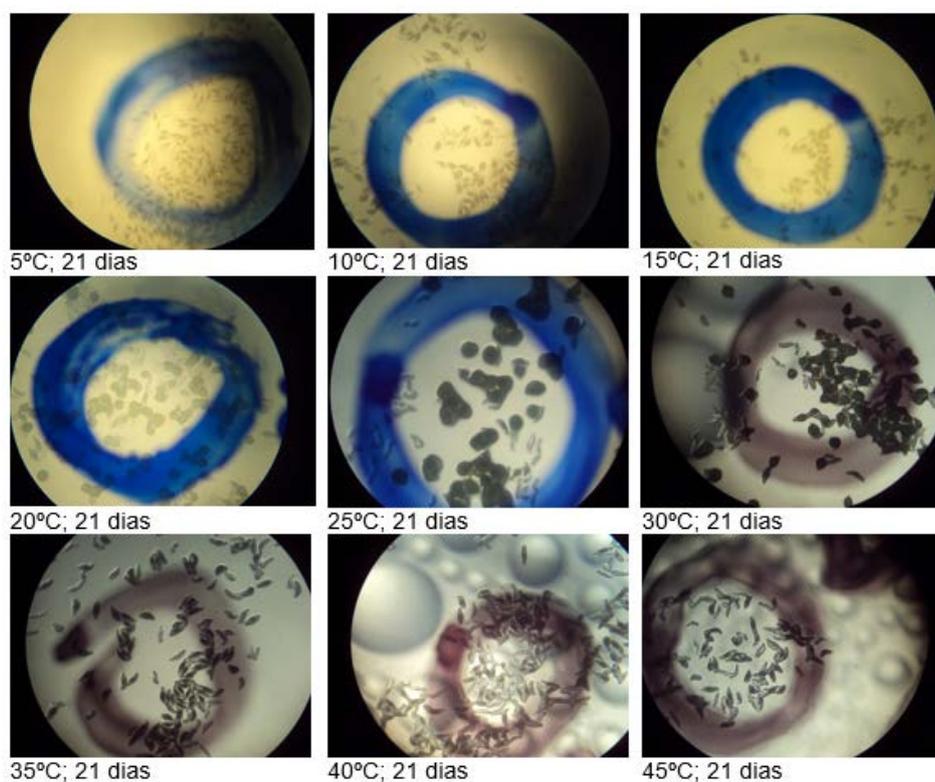
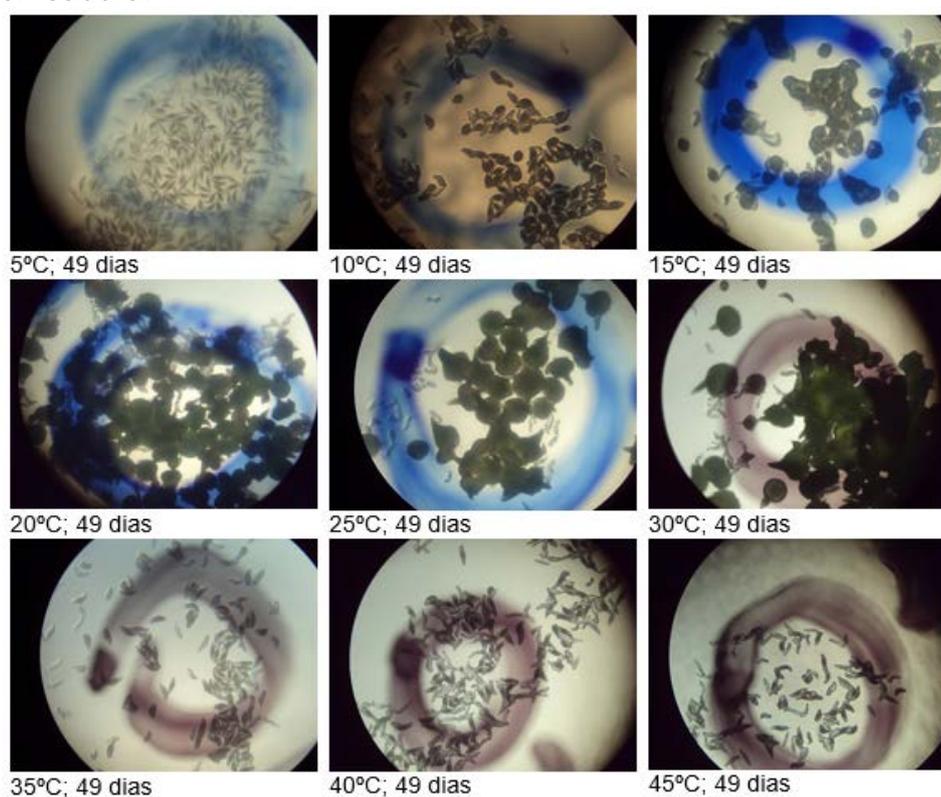


FIGURA 4.8 - Germinação assimbiótica de sementes de *Cattleya walkeriana* em meio MS em diferentes temperaturas (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 °C), 49 dias após a semeadura.



A Tabela 4.5 e a Figura 4.9 mostram que na germinação assimbiótica à temperatura de 25 °C, o lote de sementes de *C. warneri* apresentou o menor tempo médio (9 dias), maior velocidade de germinação (0,11), maior germinação acumulada (61,7%) e melhor valor de sincronismo (0,76). Na Figura 4.2-III observa-se que a partir do 28º dia de semeadura as sementes atingiram os valores máximos de germinação acumulada nas temperaturas de 20, 25 e 30 °C. Embora a temperatura de 25 °C tenha mostrado os melhores resultados, no 49º dia após a semeadura foi possível observar que os protocormos mantidos a 30 °C eram maiores que os cultivados a 25 °C (Figura 4.11).

A flor de *C. warneri* é a maior dentre as espécies do gênero *Cattleya*, o que facilitou sua coleta indiscriminada, tornando difícil encontrá-la atualmente na natureza (VAN DEN BERG, 2016). Ela predomina em florestas ombrófilas e florestas estacionais semidecíduais nos estados da região sudeste e nordeste do Brasil (Tabela 4.1). O fato de habitar regiões quentes ajuda a explicar o maior desenvolvimento dos protocormos mantidos à 30 °C. Em relação às temperaturas cardeais de *C. warneri*, foi possível determinar 25 °C como sendo a temperatura ótima, com germinação de 61,6%; 30 °C como a temperatura máxima, com germinação de 46,3% e 15 °C como temperatura mínima, com 54,2% de germinação (Tabela 4.15).

TABELA 4.5 - Valores de Tempo médio, Velocidade de germinação, U-Sincronismo calculados a partir da germinação assimbiótica das sementes da orquídea *Cattleya warneri*, em meio MS em diferentes temperaturas.

T (°C)	Tempo Médio	Velocidade	U
5	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
10	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
15	12,63±1,55	0,08±0,01	1,56±0,26
20	10,83±0,41	0,09±0,00	1,26±0,10
25	9,30±1,43	0,11±0,02	0,76±0,25
30	12,15±1,17	0,08±0,01	1,53±0,16
35	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
40	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
45	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00

Médias ± desvio padrão; T (°C) – temperatura em graus Celsius

FIGURA 4.9 - Frequências relativas de germinação das sementes de *Cattleya warneri*, semeadas em meio MS em diferentes temperaturas: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 °C. As setas representam o tempo médio de germinação para cada temperatura (Gt- Porcentagem da germinação total, Tm- Tempo médio de germinação e U- Sincronismo na germinação).

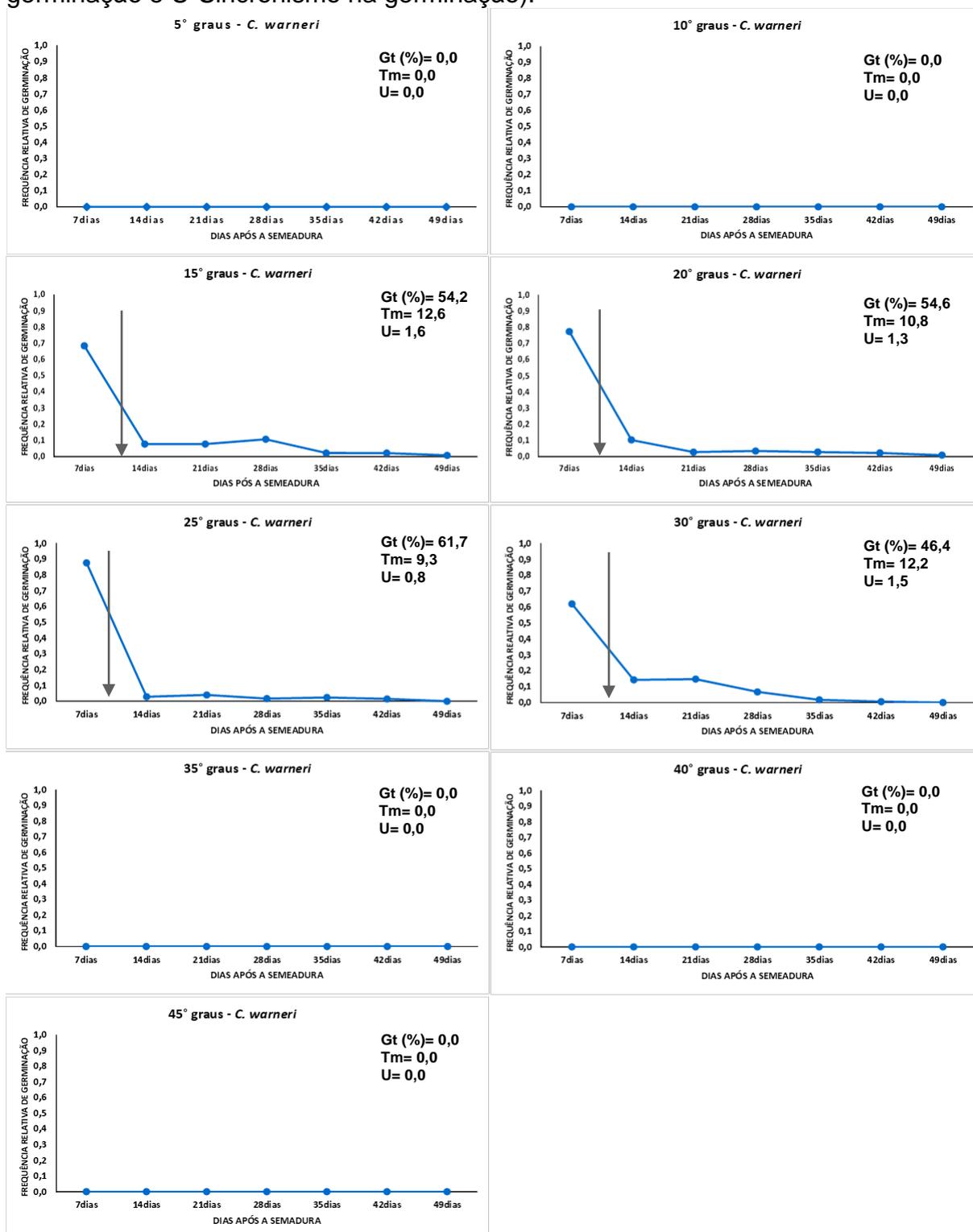


FIGURA 4.10 - Germinação assimbiótica de sementes de *Cattleya warneri* em meio MS em diferentes temperaturas (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 °C), 21 dias após a semeadura.

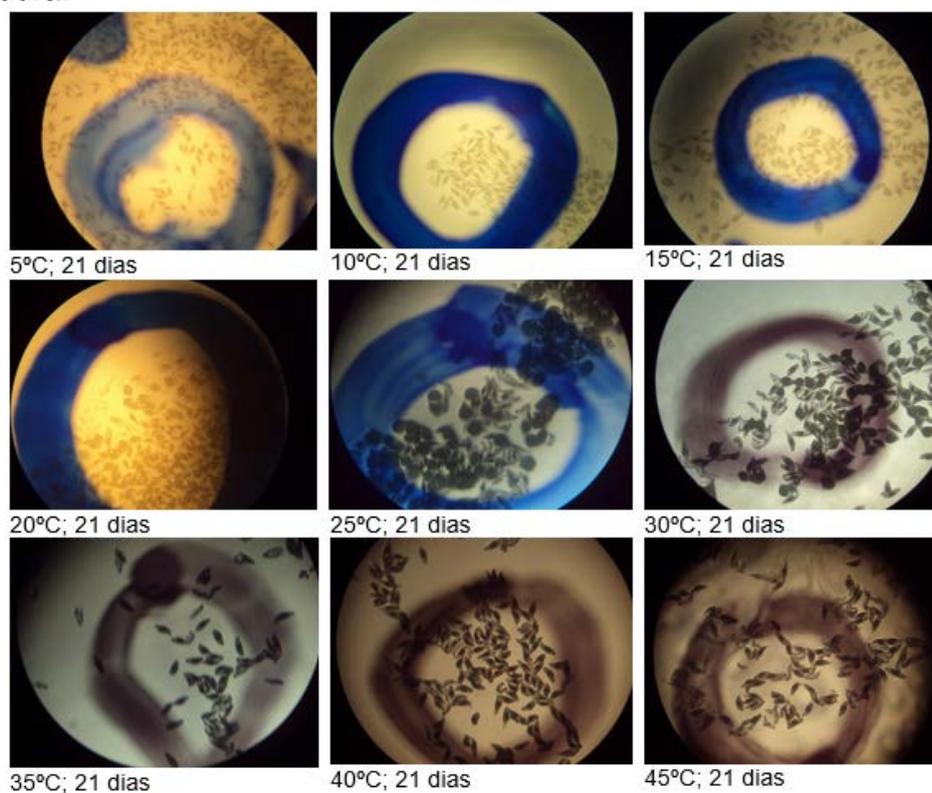
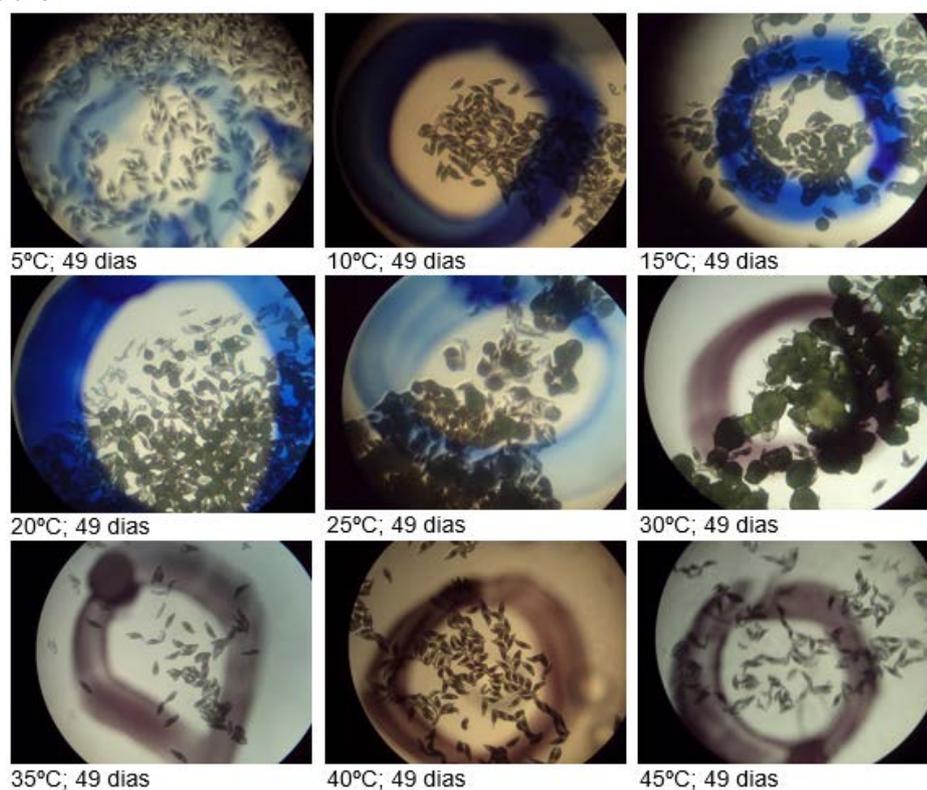


FIGURA 4.11 - Germinação assimbiótica de sementes de *Cattleya warneri* em meio MS em diferentes temperaturas (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 °C), 49 dias após a semeadura.



Para sementes *Cattleya labiata*, a temperatura de 20 °C apresentou maior valor de germinação (30,4%) e IVG (3,6). Apesar de a temperatura de 25 °C ter fornecido os maiores valores de tempo médio (13 dias), velocidade (0,08) e sincronismo (1,6) os dados de germinação e IVG correspondentes foram inferiores em relação à temperatura de 20 °C (Tabela 4.6 e Figura 4.12),.

Esse foi o lote de sementes que apresentou os menores valores de germinação, possivelmente devido ao fato de as sementes terem sido armazenadas a -18 °C por 6 meses antes dos experimentos (Tabela 4.1). *Cattleya labiata* é uma espécie endêmica do Brasil, de ocorrência nos biomas Caatinga e Mata Atlântica nos estados do Nordeste e em dois estados da região sudeste, Rio de Janeiro e Espírito Santo (Tabela 4.1). Em relação à determinação das temperaturas cardeais de *C. labiata*, foi possível definir que a temperatura máxima situa-se entre 30 e 35 °C, uma vez que a 30 °C compõe a faixa de temperatura ótima e a 35 °C já não ocorreu germinação. As melhores taxas de germinação atreladas aos menores tempos médios – indicativos da temperatura ótima – foram obtidas a 25° C (30,4% e 13,3) e a 30° C (27,7% e 13,2). A temperatura mínima definida foi de 15° C com taxa de germinação de 30,3 e tempo médio de 15,3 (Tabela 4.15).

TABELA 4.6 - Valores de Tempo médio, Velocidade de germinação, U-Sincronismo calculados a partir da germinação assimiótica das sementes da orquídea *Cattleya labiata*, em meio MS em diferentes temperaturas.

T (°C)	Tempo Médio	Velocidade	U
5	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
10	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
15	15,26±1,26	0,07±0,01	1,86±0,16
20	14,17±0,98	0,07±0,00	1,69±0,11
25	13,28±1,87	0,08±0,01	1,62±0,34
30	13,17±2,22	0,08±0,01	1,57±0,28
35	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
40	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
45	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00

Médias ± desvio padrão; T (°C) – temperatura em graus Celsius

FIGURA 4.12 - Frequências relativas de germinação das sementes de *Cattleya labiata*, semeadas em meio MS em diferentes temperaturas: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 °C. As setas representam o tempo médio de germinação para cada temperatura (Gt- Porcentagem da germinação total, Tm- Tempo médio de germinação e U- Sincronismo na germinação).

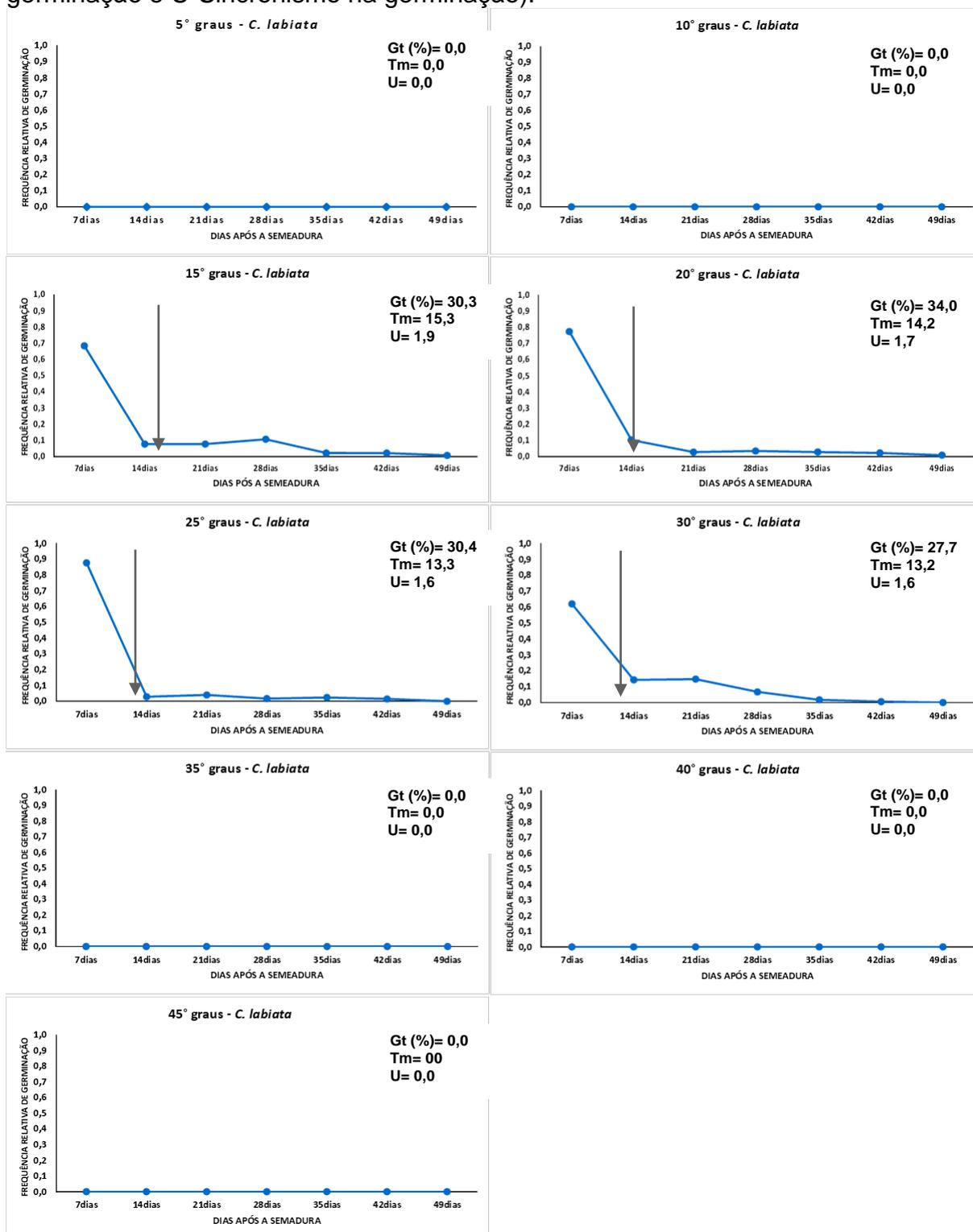


FIGURA 4.13 - Germinação assimbiótica de sementes de *Cattleya labiata* em meio MS em diferentes temperaturas (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 °C), 21 dias após a semeadura.

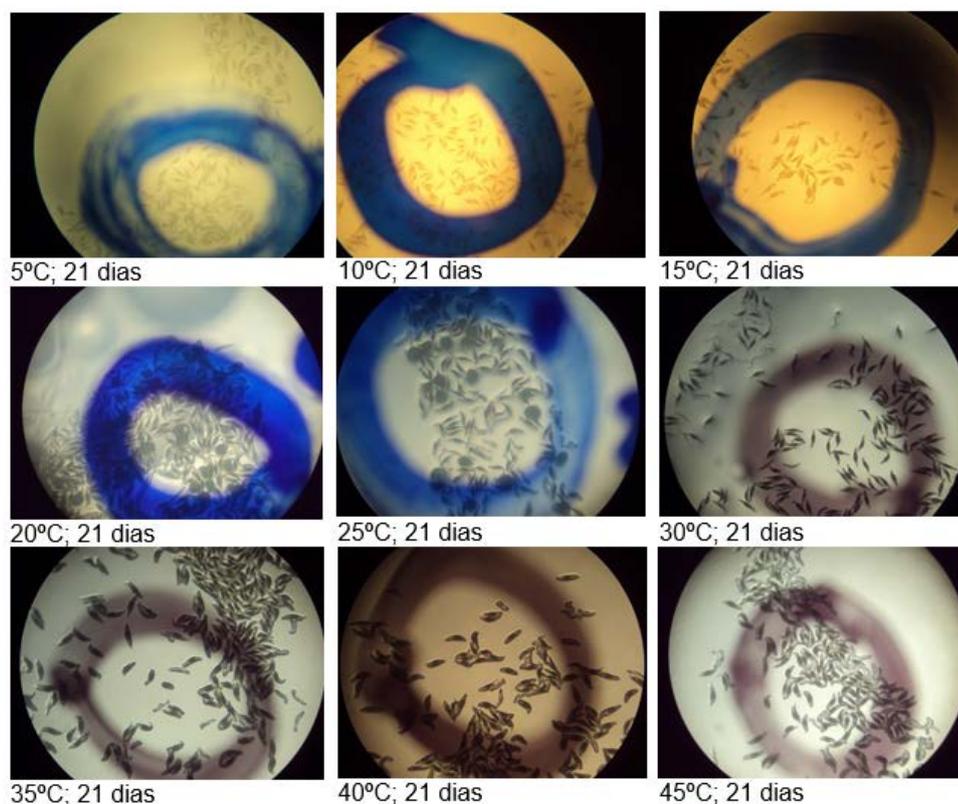
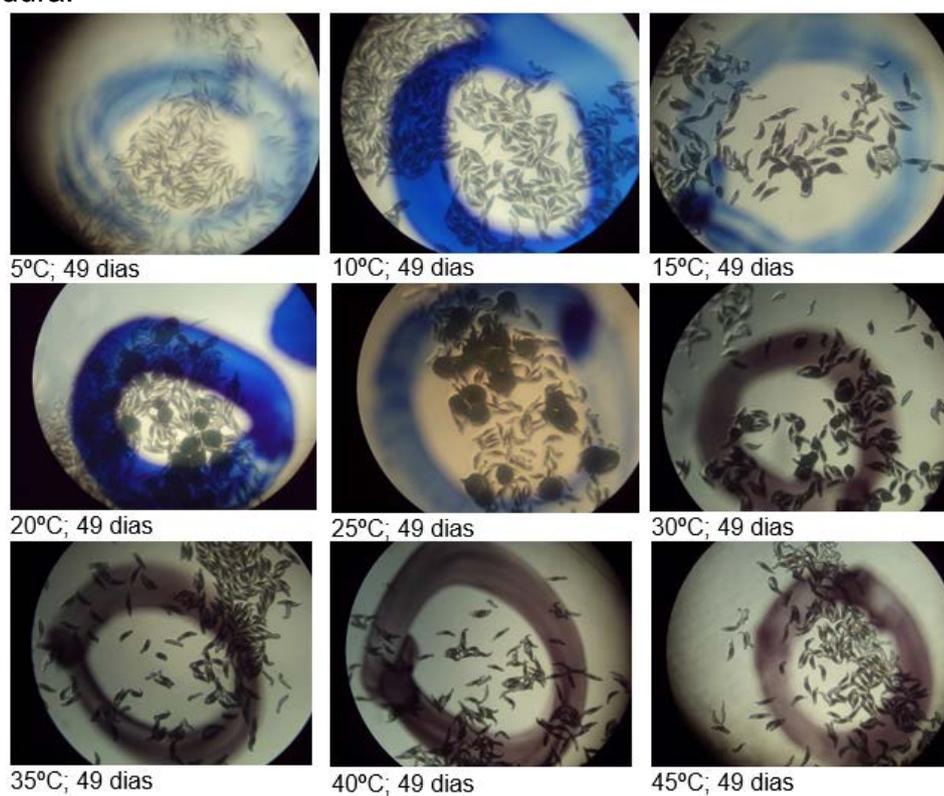


FIGURA 4.14 - Germinação assimbiótica de sementes de *Cattleya labiata* em meio MS em diferentes temperaturas (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 °C), 49 dias após a semeadura.



O tempo médio de germinação, a velocidade e o sincronismo para *C. amethystoglossa* foram bastante semelhantes para as temperaturas entre 15 e 30 °C, sendo essa a faixa de temperatura com valores maiores de germinação total e IVG (Tabela 4.7 e Figuras 4,1 e 4.2). *C. amethystoglossa* ocorre com maior frequência no estado da Bahia, mas também no Espírito Santo e Minas Gerais. A espécie parece ter uma tolerância ampla a habitats bastante distintos, pois ocorre na Mata Atlântica no sul da Bahia e Espírito Santo, mas também na Caatinga, em florestas semi-decíduas e decíduas e até em áreas bastante degradadas, onde aparece como epífita sobre licurizeiros (*Syagrus coronata*). Ocorre ainda como epífita em áreas altas na Chapada Diamantina até 1000m de altitude e também sob vegetação rala crescendo em substratos arenosos (VAN DEN BERG, 2016).

Para *C. amethystoglossa* as temperaturas cardeais determinadas foram: temperatura mínima de 15°C com 93,2% de germinação, temperatura ótima variando entre 20 °C e 25 °C com 96,4% e 97% de germinação, respectivamente, e temperatura máxima de 30 °C com 93,5% de germinação (Tabela 4.15).

TABELA 4.7 - Valores de Tempo médio, Velocidade de germinação, U-Sincronismo calculados a partir da germinação assimbiótica das sementes da orquídea *Cattleya amethystoglossa*, em meio MS em diferentes temperaturas.

T (°C)	Tempo Médio	Velocidade	U
5	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
10	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
15	9,3±0,8	0,1±0,0	0,9±0,2
20	9,5±2,1	0,1±0,0	0,8±0,7
25	9,2±1,2	0,1±0,0	0,8±0,5
30	9,1±0,5	0,1±0,0	0,8±0,1
35	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
40	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
45	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0

Médias ± desvio padrão; T (°C) – temperatura em graus Celsius

FIGURA 4.15 - Frequências relativas de germinação das sementes de *Cattleya amethystoglossa*, semeadas em meio MS em diferentes temperaturas: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 °C. As setas representam o tempo médio de germinação para cada temperatura (Gt- Porcentagem da germinação total, Tm-Tempo médio de germinação e U-Sincronismo na germinação).

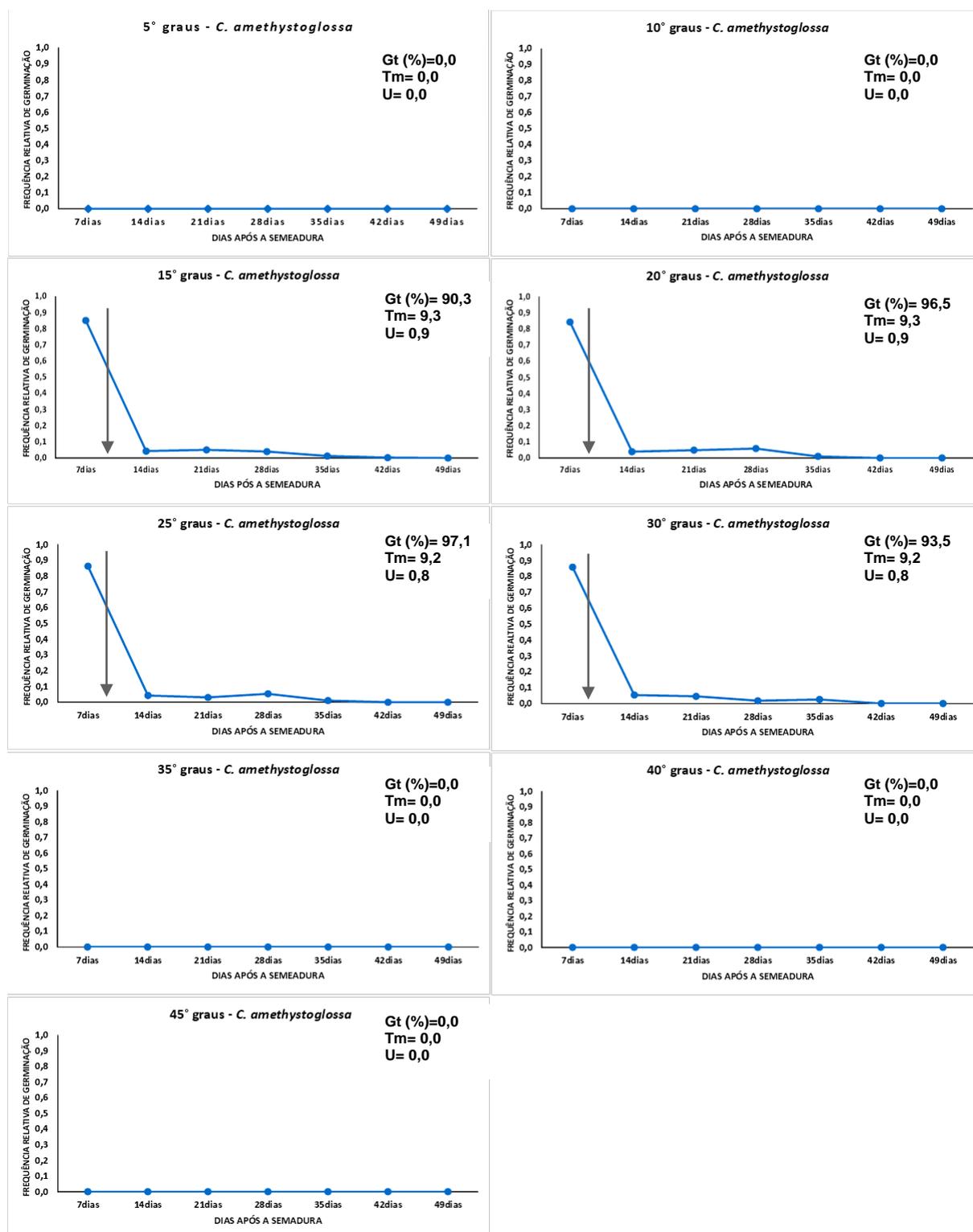


FIGURA 4.16 - Germinação assimbiótica de sementes de *Cattleya amethystoglossa* em meio MS em diferentes temperaturas (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 °C), 21 dias após a semeadura.

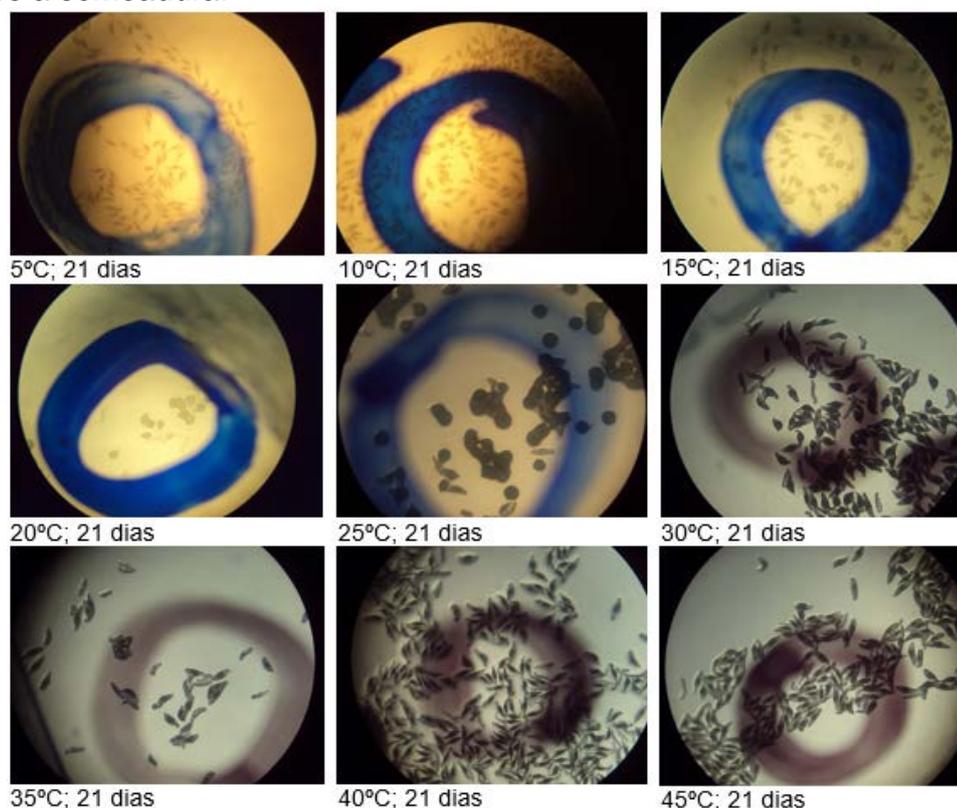
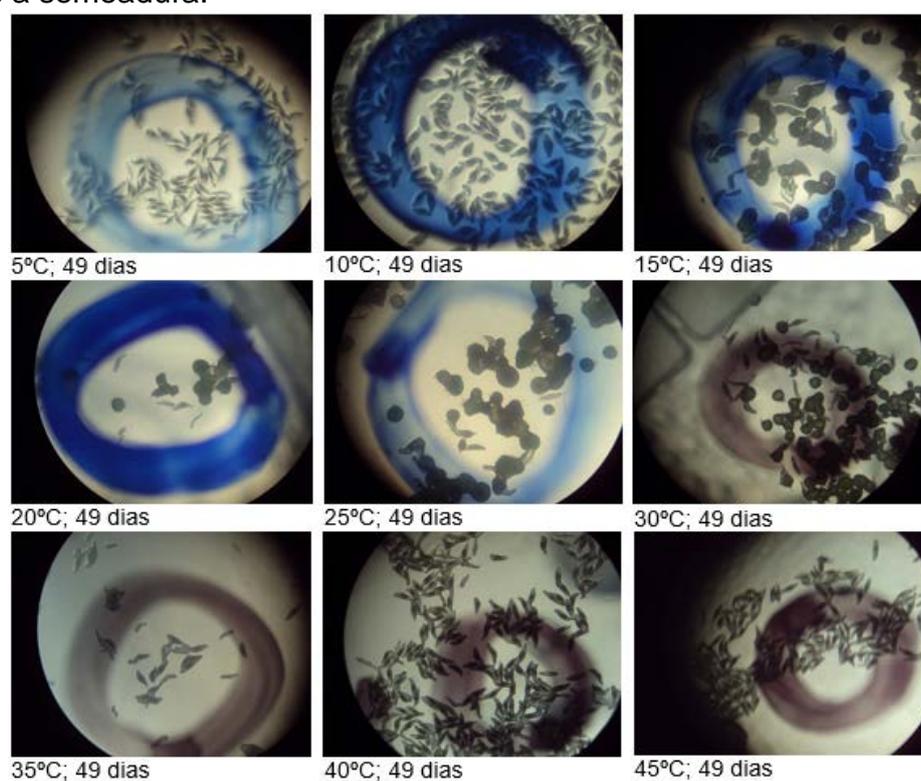


FIGURA 4.17 - Germinação assimbiótica de sementes de *Cattleya amethystoglossa* em meio MS em diferentes temperaturas (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 °C), 49 dias após a semeadura.



Para *C. loddigesii* o valor de germinação obtido nas temperaturas de 15 a 30 °C foi de 100%. O menor tempo médio e sincronismo ocorreram na temperatura de 25 °C – 2,46 dias e 0,06 – já a melhor velocidade de germinação foi de 0,13 na temperatura de 20 °C (Tabela 4.8 e Figura 4.18). *Cattleya loddigesii* é a espécie mais comum do gênero no estado de São Paulo e sul de Minas Gerais, ocorrendo em áreas de Cerrado e em Florestas Estacional Semidecidual e Floresta Ombrófila. Para *C. loddigesii* a germinação ocorreu apenas entre 15 e 30 °C, entretanto nesse intervalo a taxa de germinação foi de 100%, portanto a determinação das temperaturas cardeais foi realizada com base nos valores tempo médio obtidos. A temperatura ótima foi de 25 °C com tempo médio de 2,5 dias; a temperatura mínima foi de 15 °C com 10,1 dias, já a máxima foi de 30°C com 4,9 dias de tempo médio (Tabela 4.15).

TABELA 4.8 - Valores de Tempo médio, Velocidade de germinação, U-Sincronismo calculados a partir da germinação assimbiótica das sementes da orquídea *Cattleya loddigesii*, em meio MS em diferentes temperaturas.

T (°C)	Tempo Médio	Velocidade	U
5	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
10	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
15	10,11±0,39	0,10±0,00	1,02±0,09
20	7,78±0,19	0,13±0,00	0,39±0,04
25	2,46±0,26	0,05±0,08	0,06±0,10
30	4,89±0,44	0,09±0,08	0,11±0,11
35	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
40	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
45	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00

Médias ± desvio padrão; T (°C) – temperatura em graus Celsius

FIGURA 4.18 - Frequências relativas de germinação das sementes de *Cattleya loddigesii*, semeadas em meio MS em diferentes temperaturas: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 °C. As setas representam o tempo médio de germinação para cada temperatura (Gt- Porcentagem da germinação total, Tm-Tempo médio de germinação e U-Sincronismo na germinação).

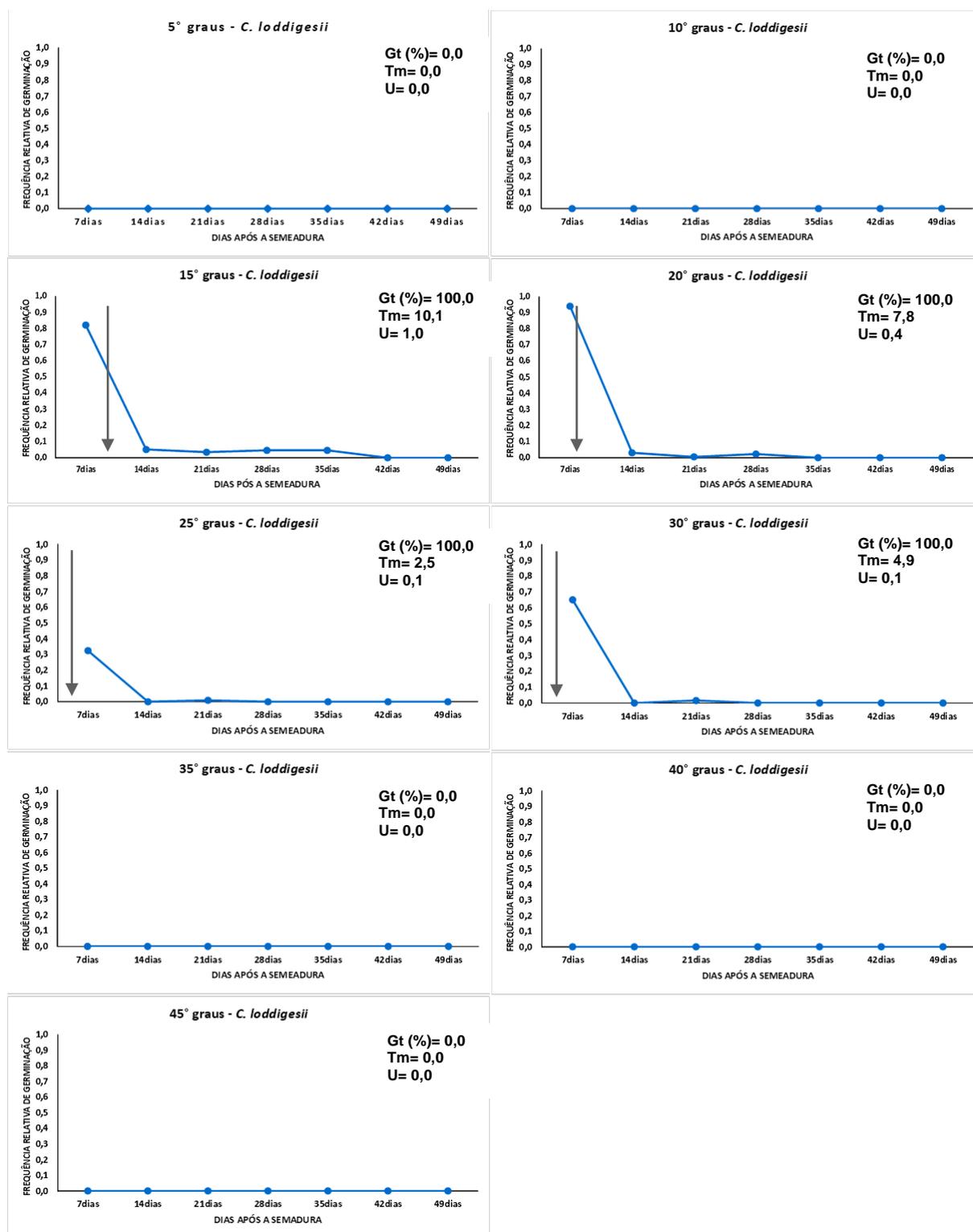


FIGURA 4.19 - Germinação assimbiótica de sementes de *Cattleya loddigesii* em meio MS em diferentes temperaturas (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 °C), 21 dias após a semeadura.

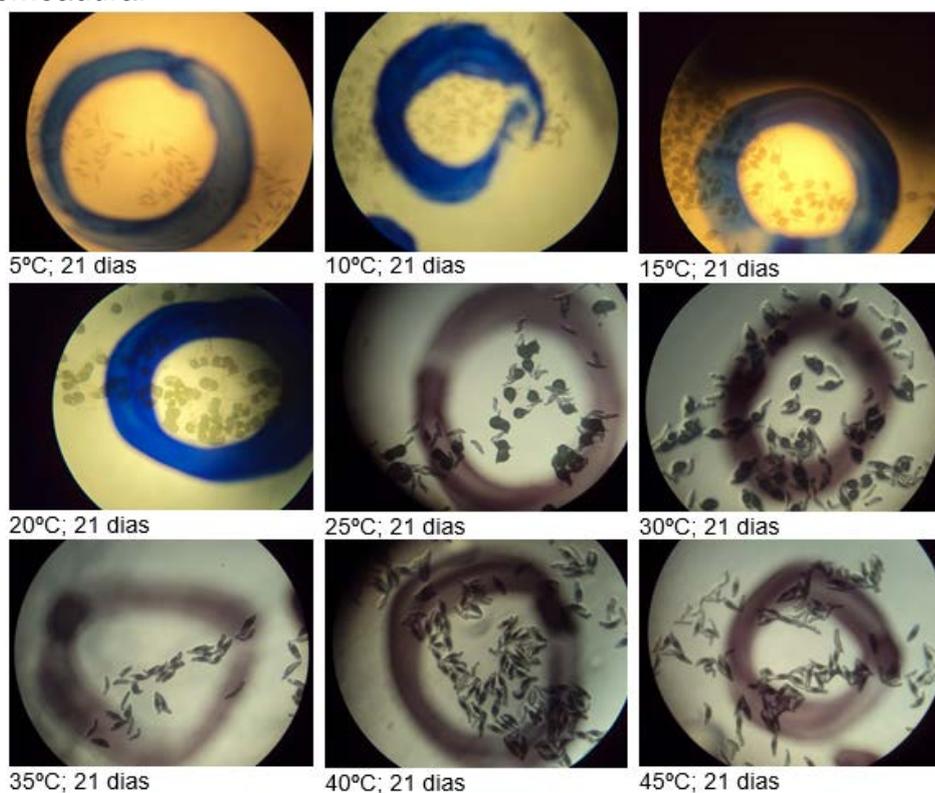
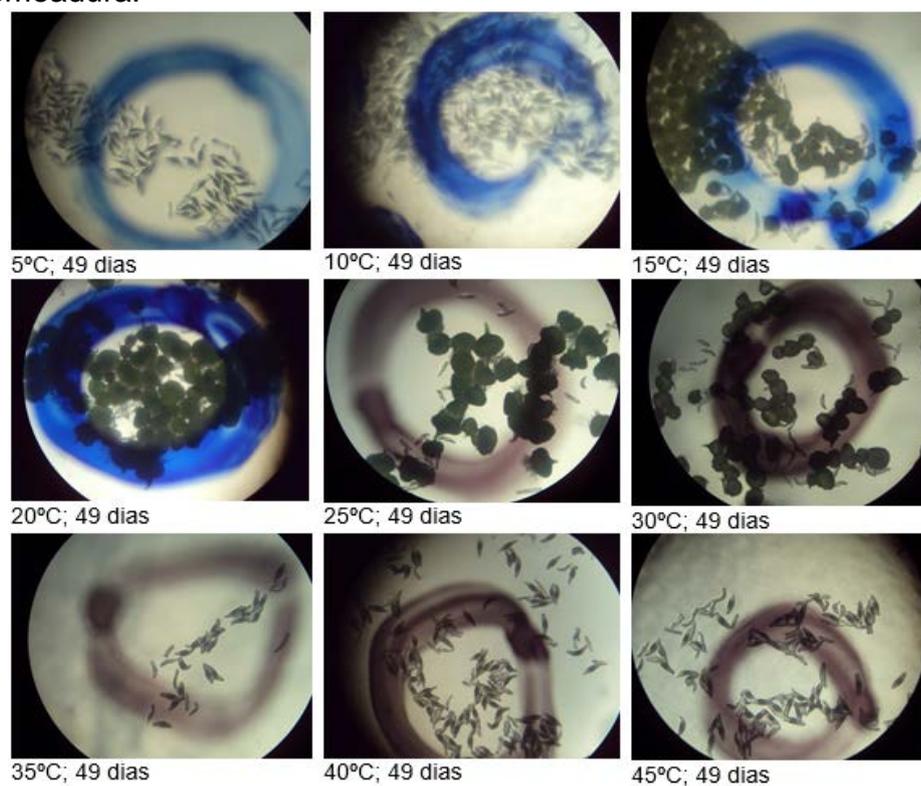


FIGURA 4.20 - Germinação assimbiótica de sementes de *Cattleya loddigesii* em meio MS em diferentes temperaturas (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 °C), 49 dias após a semeadura.



Os melhores valores de tempo médio de germinação, velocidade e sincronismo para *C. brevicaulis* foram semelhantes a 25 e 30 °C (Tabela 4.9). *C. brevicaulis* é uma espécie endêmica do Brasil, encontrada em regiões de Cerrado e Mata Atlântica, nos estados de Minas Gerais e Espírito Santo.

Em relação à determinação das temperaturas cardeais para *C. brevicaulis*, 10 °C foi considerada a temperatura mínima, com germinação de 76,6%. Já a temperatura ótima ficou na faixa entre 25 e 30° C, que apresentaram os menores tempos médios e taxas de germinação de 99,4% e 97,9%, respectivamente. Por fim, a temperatura máxima situa-se na faixa de 30 °C a 35 °C, já que 30° C compõe a faixa ótima e a 35° C já não houve germinação (Tabela 4.15).

TABELA 4.9 - Valores de Tempo médio, Velocidade de germinação, U-Sincronismo calculados a partir da germinação assimbiótica das sementes da orquídea *Cattleya brevicaulis*, em meio MS em diferentes temperaturas.

T (°C)	Tempo Médio	Velocidade	U
5	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
10	11,11±1,55	0,09±0,01	1,38±0,32
15	8,95±0,15	0,11±0,00	0,93±0,04
20	8,24±0,48	0,12±0,01	0,68±0,15
25	7,78±0,27	0,13±0,00	0,45±0,19
30	7,68±0,42	0,13±0,01	0,40±0,23
35	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
40	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
45	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00

Médias ± desvio padrão; T (°C) – temperatura em graus Celsius

FIGURA 4.21 - Frequências relativas de germinação das sementes de *Cattleya brevicaulis*, semeadas em meio MS em diferentes temperaturas: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 °C. As setas representam o tempo médio de germinação para cada temperatura (Gt- Porcentagem da germinação total, Tm-Tempo médio de germinação e U-Sincronismo na germinação).

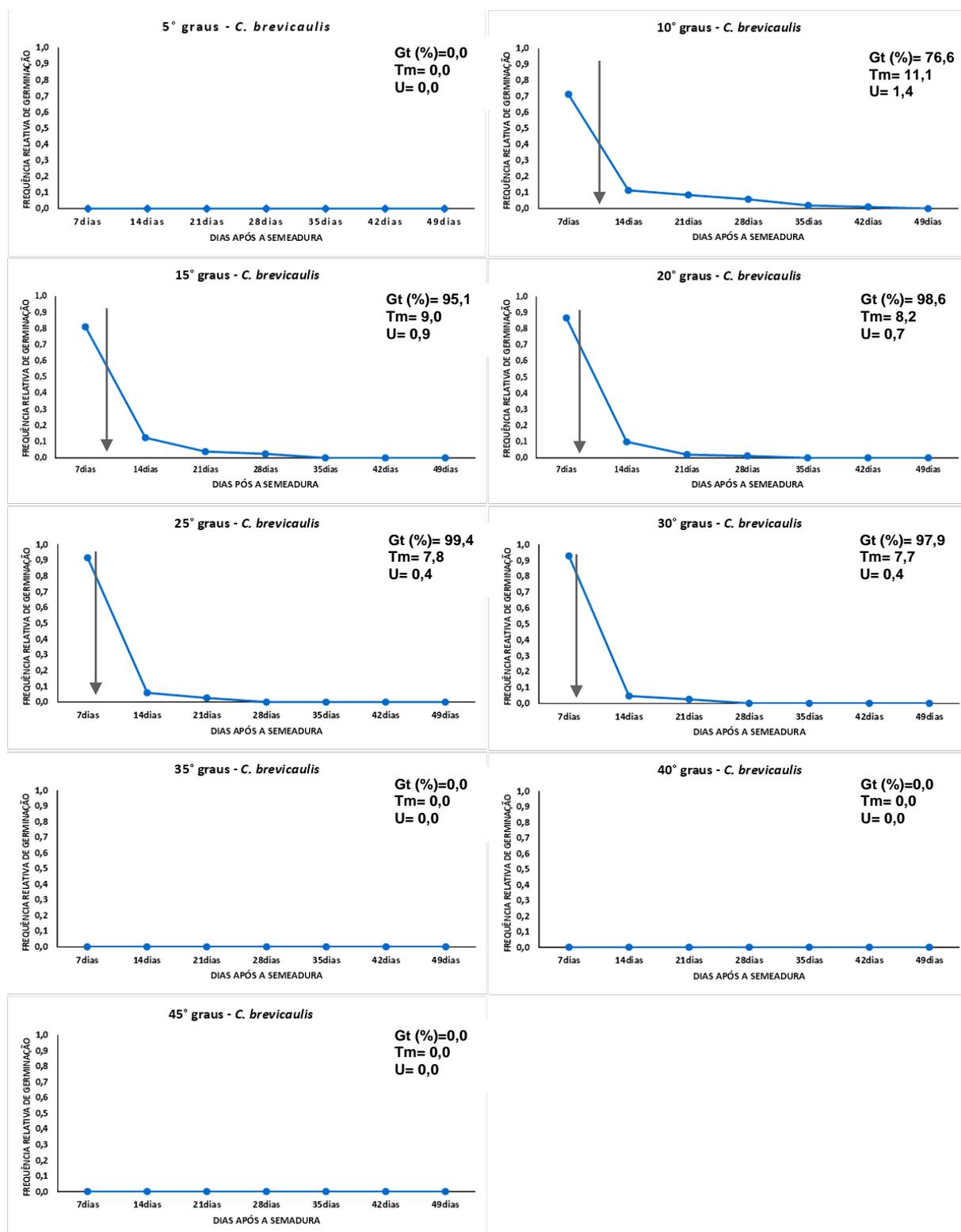


FIGURA 4.22 - Germinação assimbiótica de sementes de *Cattleya brevicaulis* em meio MS em diferentes temperaturas (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 °C), 21 dias após a sementeira.

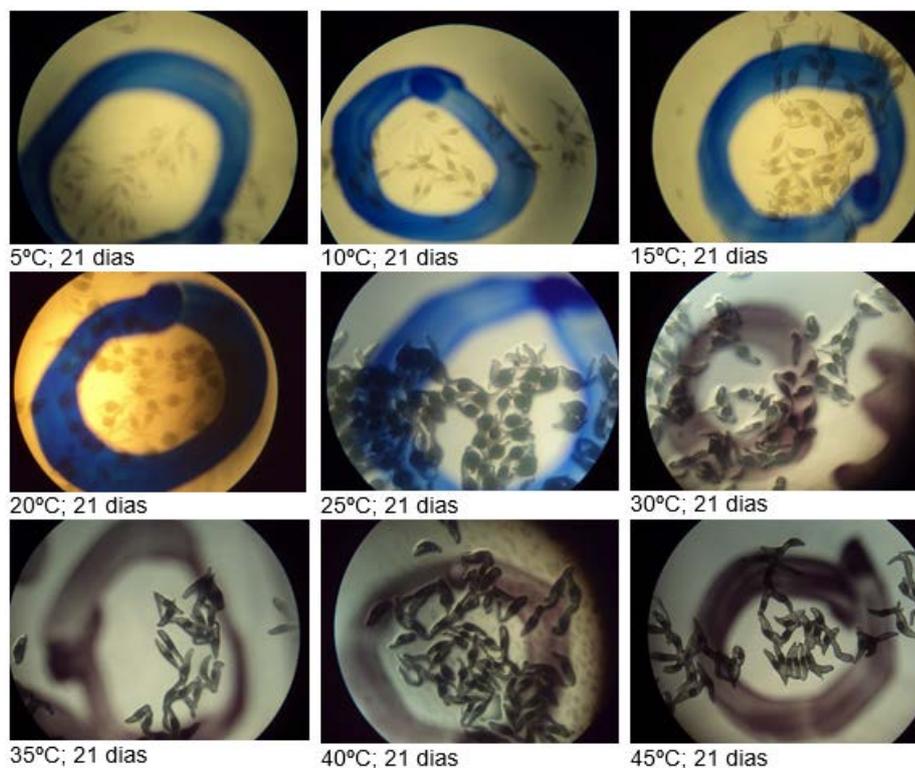
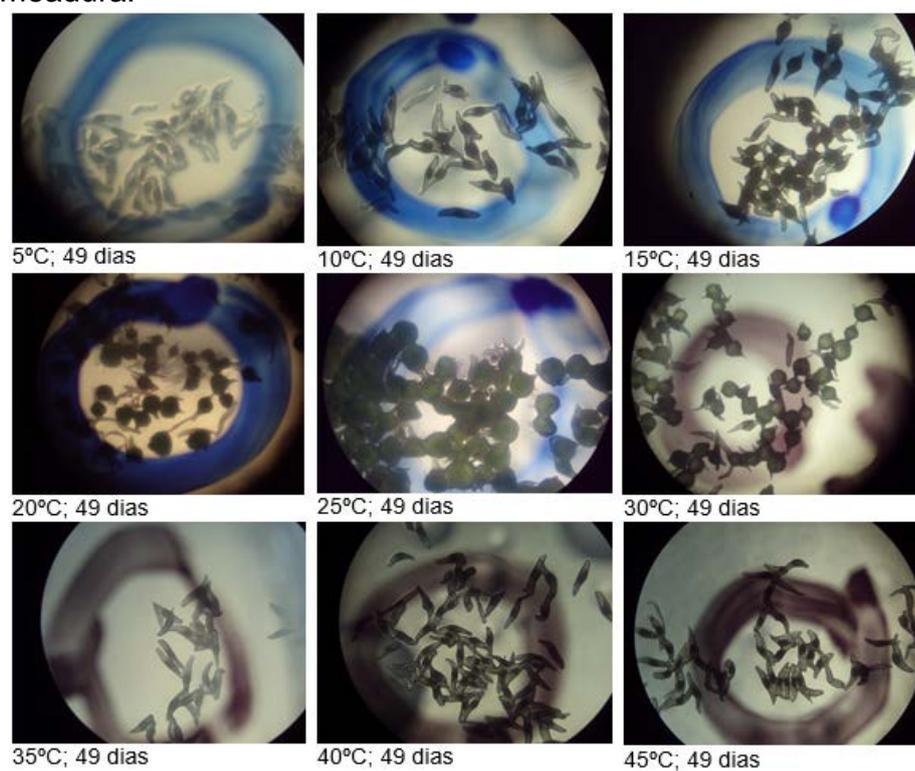


FIGURA 4.23 - Germinação assimbiótica de sementes de *Cattleya brevicaulis* em meio MS em diferentes temperaturas (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 °C), 49 dias após a sementeira.



O lote de sementes de *C. jongheana* apresentou melhor valor de germinação total a 25 °C. Nesta temperatura observou-se o tempo médio de germinação de 9 dias e uma velocidade de germinação semelhante à obtida em outras temperaturas (Tabela 4.7 e Figura 4.14). O lote de sementes de *C. jongheana* não passou pelo processo de armazenamento, o que pode ter sido um dos fatores que contribuiu para uma germinação total. Em temperaturas mais baixas foi possível verificar que a frequência de germinação distribuiu-se mais amplamente pelo período de germinação. A 10 °C houve uma assimetria na distribuição do período de germinação, com maior tempo médio e uma distribuição polimodal das frequências. Laboriau; Agudo (1987) creditam este padrão de distribuição à compensação das condições desfavoráveis de temperatura (Figura 4.24).

C. jongheana habita áreas de Cerrado e Mata Atlântica com fisionomias de vegetação da Floresta Estacional Semidecidual. Para *C. jongheana* as temperaturas cardiais determinadas foram: temperatura mínima de 10 °C com 41,7% de germinação, temperatura ótima variando entre 20 e 25°C, com germinação de 96,9% a 100,0% e temperatura máxima de 30 °C com 86,2% de germinação (Tabela 4.15).

TABELA 4.10 - Valores de Tempo médio, Velocidade de germinação, U-Sincronismo calculados a partir da germinação assimbiótica das sementes da orquídea *Cattleya jongheana*, em meio MS em diferentes temperaturas.

T (°C)	Tempo Médio	Velocidade	U
5	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
10	25,39±2,72	0,04±0,00	2,11±0,18
15	11,05±1,36	0,09±0,01	1,30±0,22
20	9,45±0,23	0,11±0,00	1,06±0,03
25	9,36±0,23	0,11±0,00	1,06±0,06
30	10,84±1,28	0,09±0,01	1,31±0,33
35	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
40	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
45	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00

Médias ± desvio padrão; T (°C) – temperatura em graus Celsius

FIGURA 4.24 - Frequências relativas de germinação das sementes de *Cattleya jongheana*, semeadas em meio MS em diferentes temperaturas: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 °C. As setas representam o tempo médio de germinação para cada temperatura (Gt- Porcentagem da germinação total, Tm-Tempo médio de germinação e U-Sincronismo na germinação).

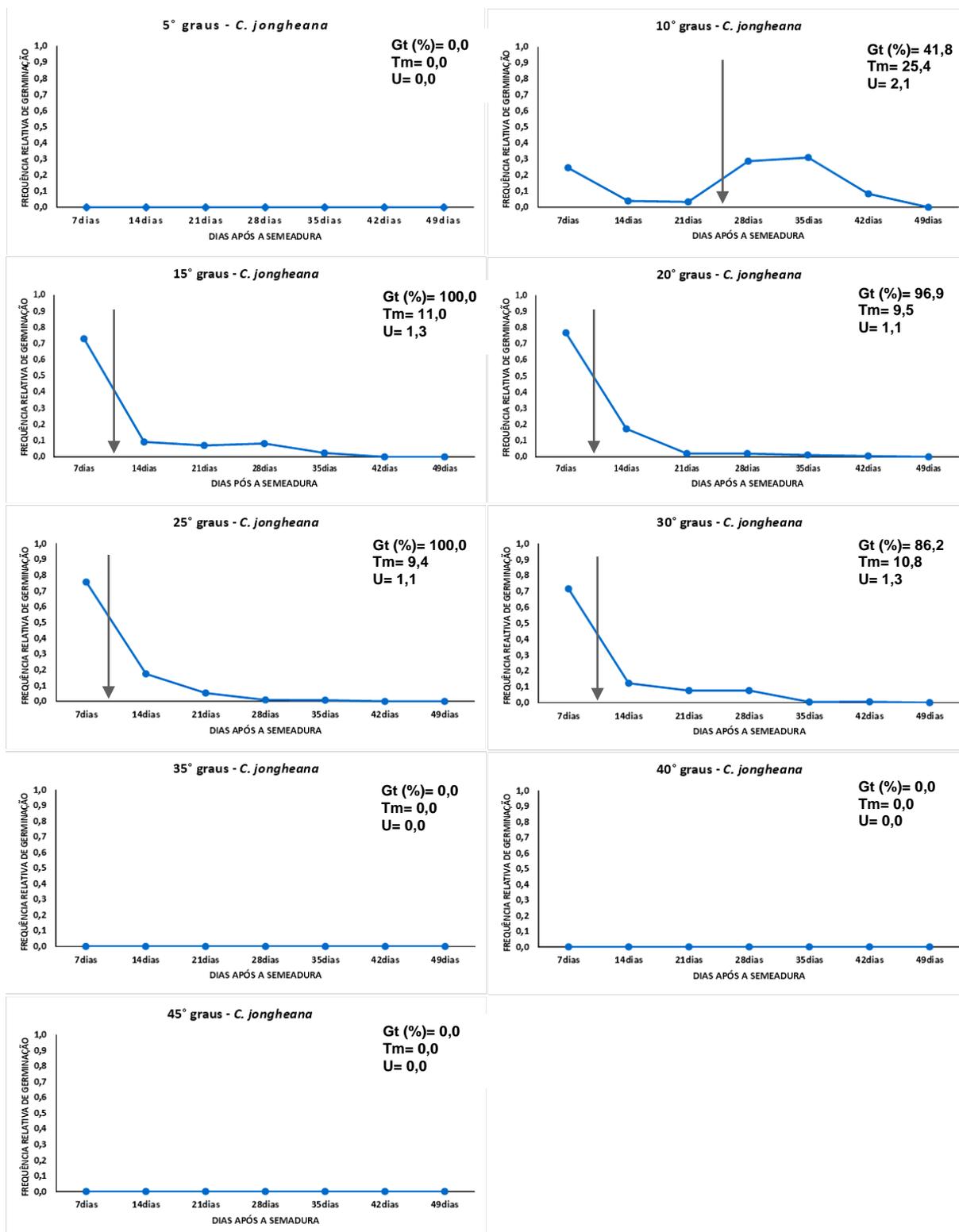


FIGURA 4.25 - Germinação assimbiótica de sementes de *Cattleya jongheana* em meio MS em diferentes temperaturas (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 °C), 21 dias após a sementeira.

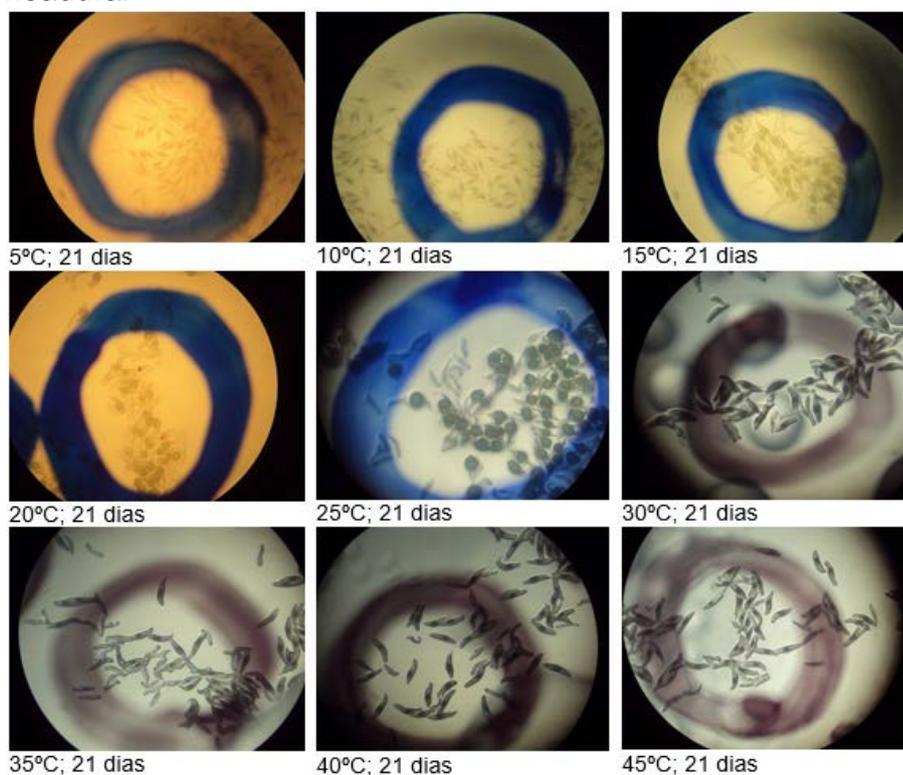
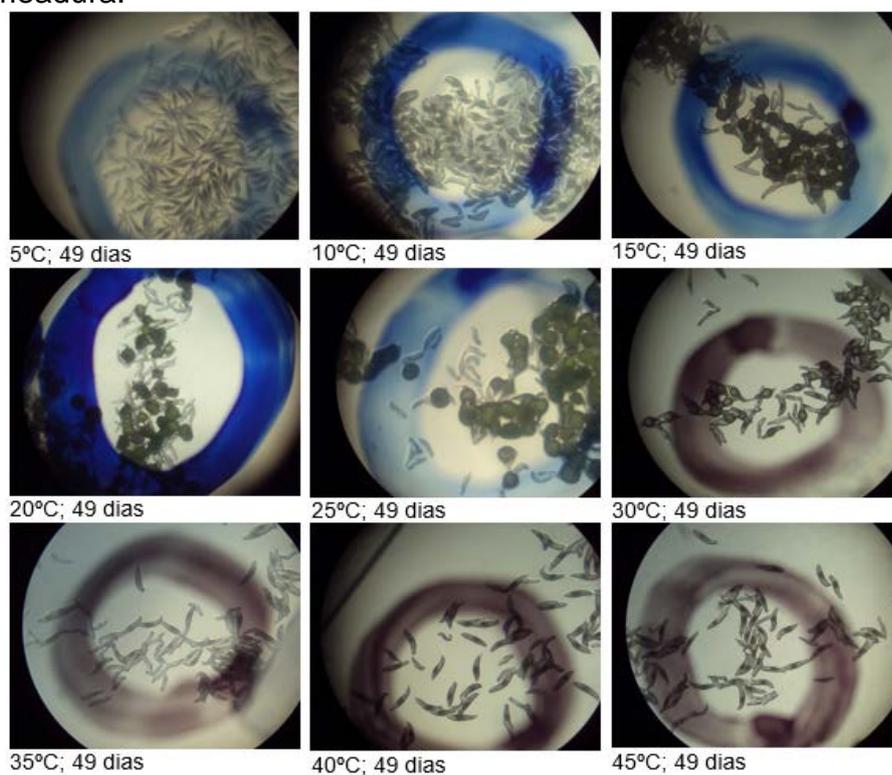


FIGURA 4.26 - Germinação assimbiótica de sementes de *Cattleya jongheana* em meio MS em diferentes temperaturas (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 °C), 49 dias após a sementeira.



Na germinação assimbiótica de *C. schilleriana* as temperaturas de 25 e 30 °C apresentaram os melhores valores de germinação total, IVG, tempo médio, velocidade de germinação e sincronismo (Tabela 4.11 e Figura 4.27). A espécie *C. schilleriana* ocorre em regiões da Bahia, Espírito Santo e Rio de Janeiro.

Em relação à determinação das temperaturas cardeais, para *C. schilleriana* considerou-se 10° C como temperatura mínima, com germinação de 58,4%. A temperatura ótima ficou na faixa entre 25 e 30° C, pois nela as taxas de germinação obtidas foram semelhantes (98,3% e 98,1%, respectivamente) bem como os tempos médios (7,5 e 7,4 dias, respectivamente). Já a temperatura máxima situa-se entre 30 °C e 35 °C, uma vez que 30° C compõe a faixa de temperatura ótima e a 35° C não houve germinação (Tabela 4.15).

TABELA 4.11 - Valores de Tempo médio, Velocidade de germinação, U-Sincronismo calculados a partir da germinação assimbiótica das sementes da orquídea *Cattleya schilleriana*, em meio MS em diferentes temperaturas.

T (°C)	Tempo Médio	Velocidade	U
5	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
10	15,58±3,93	0,07±0,02	1,65±0,37
15	8,23±0,43	0,12±0,01	0,52±0,04
20	7,66±0,16	0,13±0,00	0,38±0,06
25	7,55±0,50	0,13±0,01	0,32±0,16
30	7,44±0,09	0,13±0,00	0,32±0,02
35	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
40	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
45	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00

Médias ± desvio padrão; T (°C) – temperatura em graus Celsius

FIGURA 4.27 - Frequências relativas de germinação das sementes de *Cattleya schilleriana*, semeadas em meio MS em diferentes temperaturas: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 °C. As setas representam o tempo médio de germinação para cada temperatura (Gt- Porcentagem da germinação total, Tm-Tempo médio de germinação e U-Sincronismo na germinação).

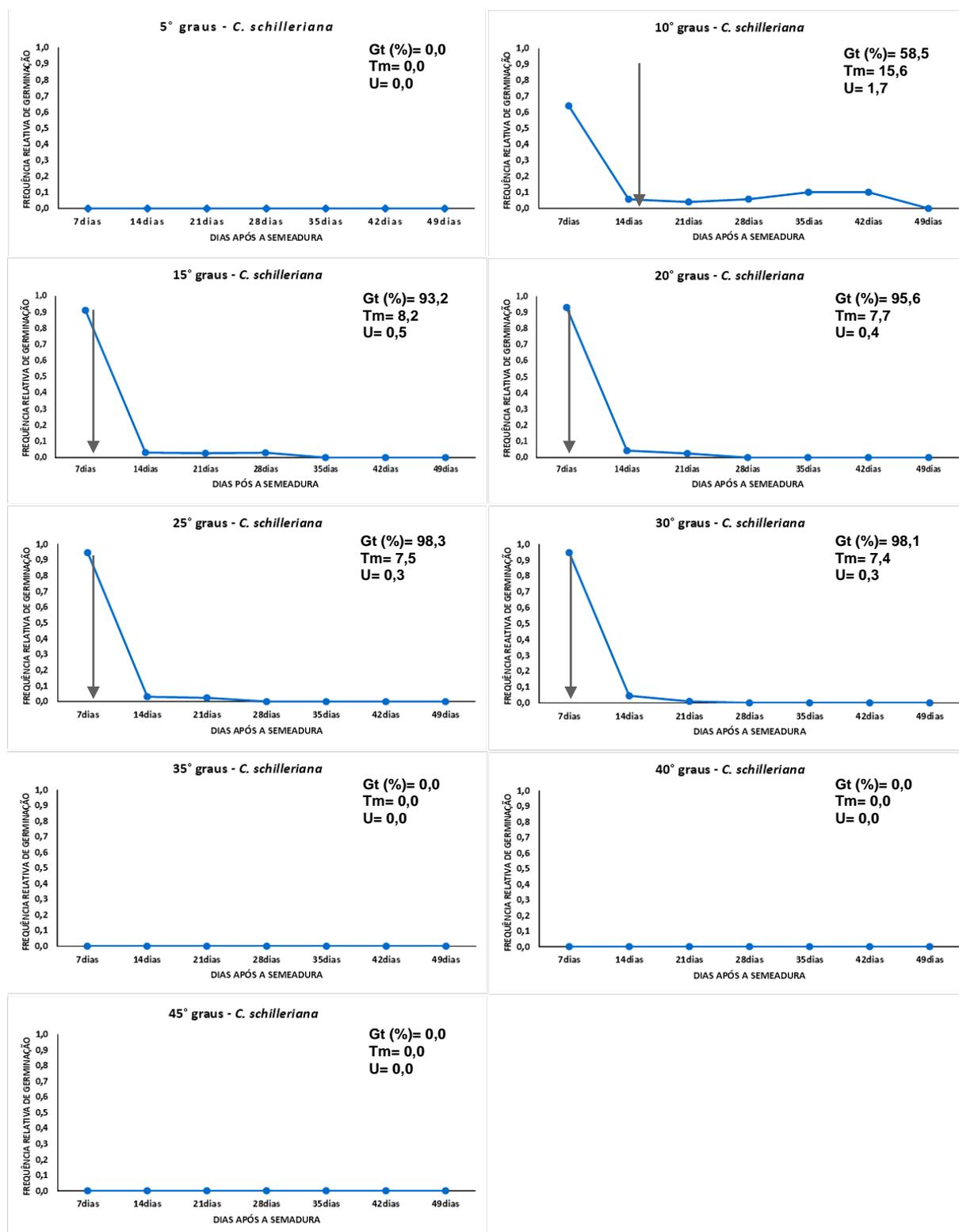


FIGURA 4.28 - Germinação assimbiótica de sementes de *Cattleya schilleriana* em meio MS em diferentes temperaturas (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 °C), 21 dias após a semeadura.

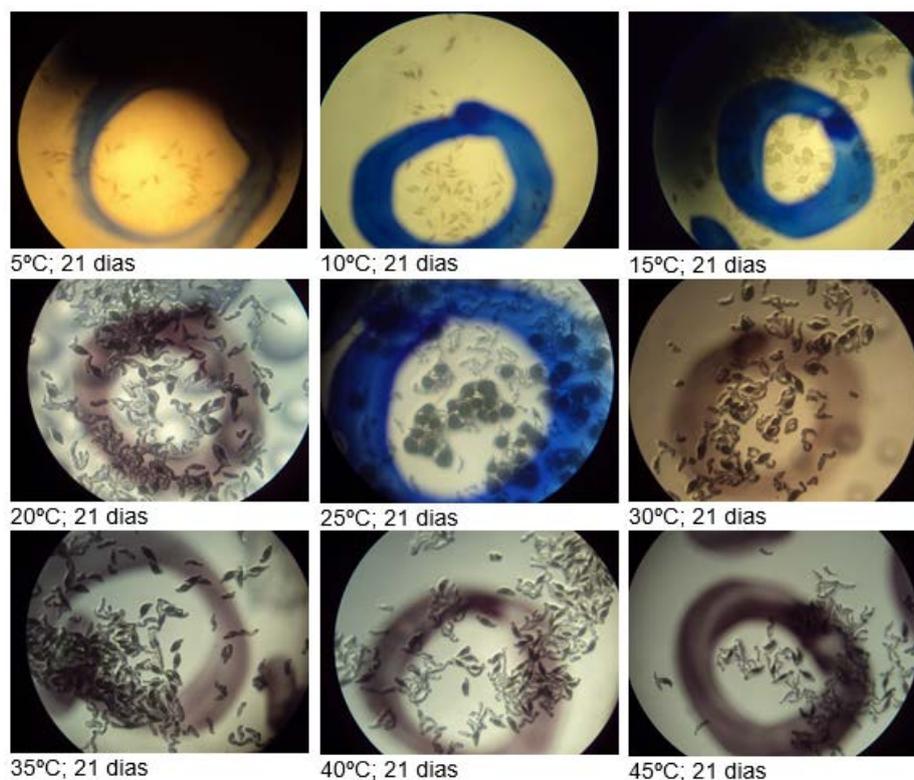
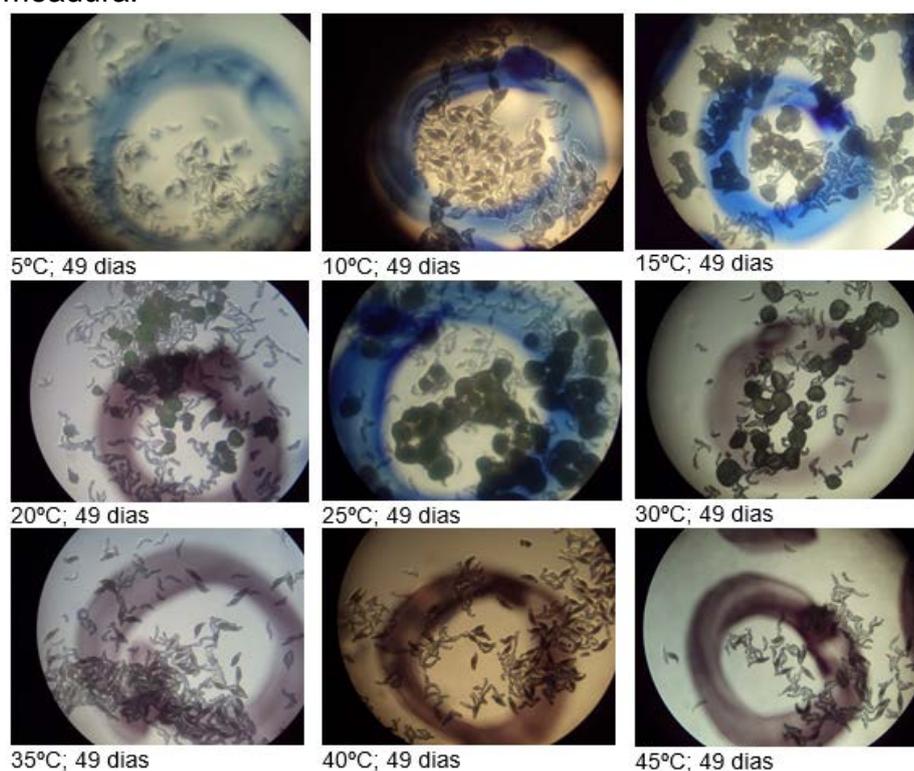


FIGURA 4.29 - Germinação assimbiótica de sementes de *Cattleya schilleriana* em meio MS em diferentes temperaturas (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 °C), 49 dias após a semeadura.



A Tabela 4.12 apresenta os dados de germinação assimbiótica de *C. tigrina*, cujas sementes apresentaram valores semelhantes e melhores em relação à germinação total, IVG, tempo médio, velocidade de germinação e sincronismo nas temperaturas 20 e 25 °C.

A espécie *C. tigrina* distribui-se por estados da região sul, sudeste e nordeste do Brasil, ocorrendo em áreas da Mata Atlântica. Para *C. tigrina* as temperaturas cardiais determinadas foram: temperatura mínima de 15 °C, com 86,6% de germinação; temperatura ótima variando entre 20 e 25 °C – com germinação de 95,6% e 96,0%, respectivamente – e temperatura máxima de 30 °C, com 91,6% de germinação (Tabela 4.15).

TABELA 4.12 - Valores de Tempo médio, Velocidade de germinação, U-Sincronismo calculados a partir da germinação assimbiótica das sementes da orquídea *Cattleya tigrina*, em meio MS em diferentes temperaturas.

T (°C)	Tempo Médio	Velocidade	U
5	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
10	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
15	12,59±0,88	0,08±0,01	1,27±0,18
20	8,57±0,49	0,12±0,01	0,54±0,15
25	8,45±0,68	0,12±0,01	0,57±0,19
30	9,22±0,40	0,11±0,00	0,86±0,25
35	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
40	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
45	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00

Médias ± desvio padrão; T (°C) – temperatura em graus Celsius

FIGURA 4.30 - Frequências relativas de germinação das sementes de *Cattleya tigrina*, semeadas em meio MS em diferentes temperaturas: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 °C. As setas representam o tempo médio de germinação para cada temperatura (Gt- Porcentagem da germinação total, Tm-Tempo médio de germinação e U-Sincronismo na germinação).

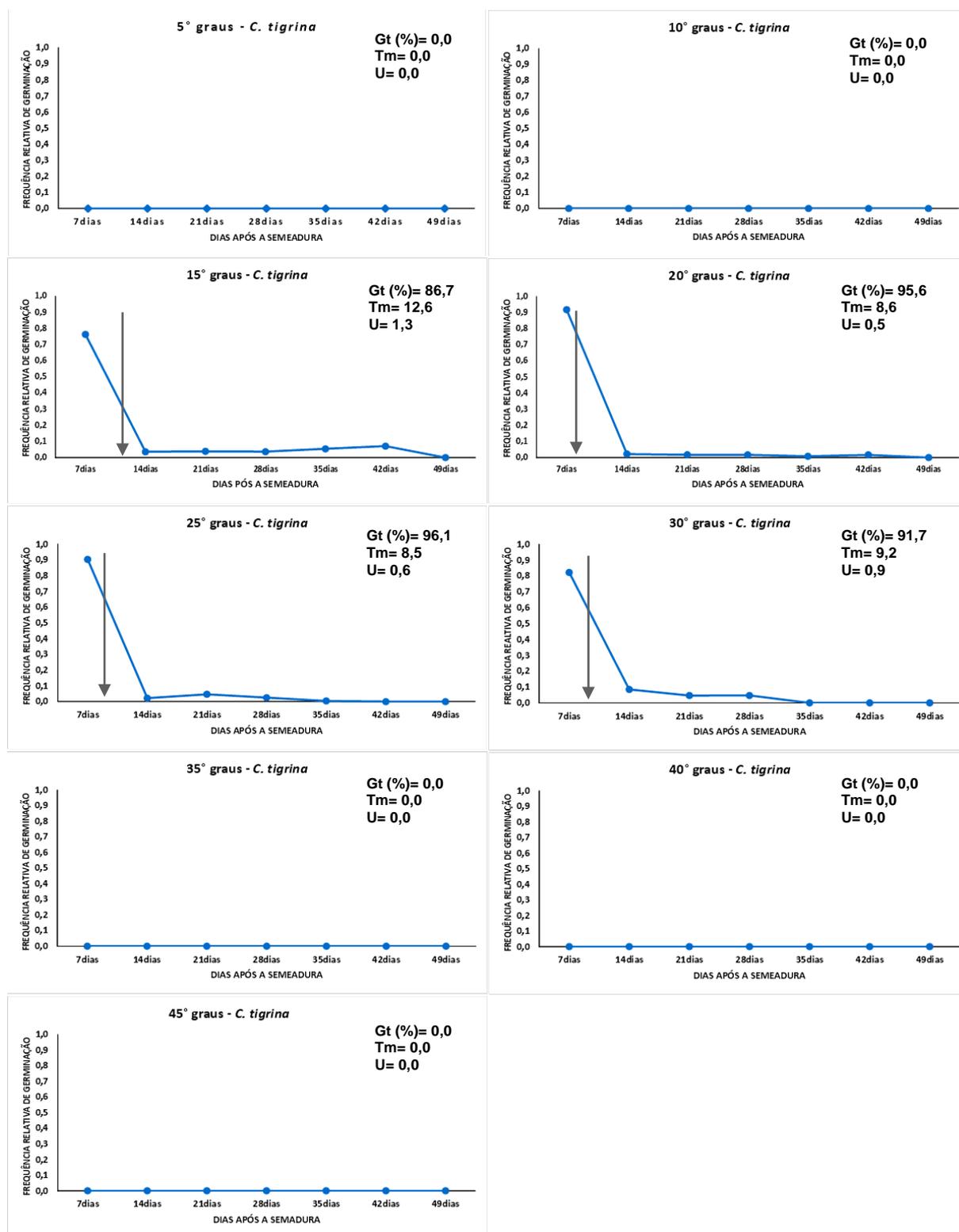


FIGURA 4.31 - Germinação assimbiótica de sementes de *Cattleya tigrina* em meio MS em diferentes temperaturas (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 °C), 21 dias após a semeadura.

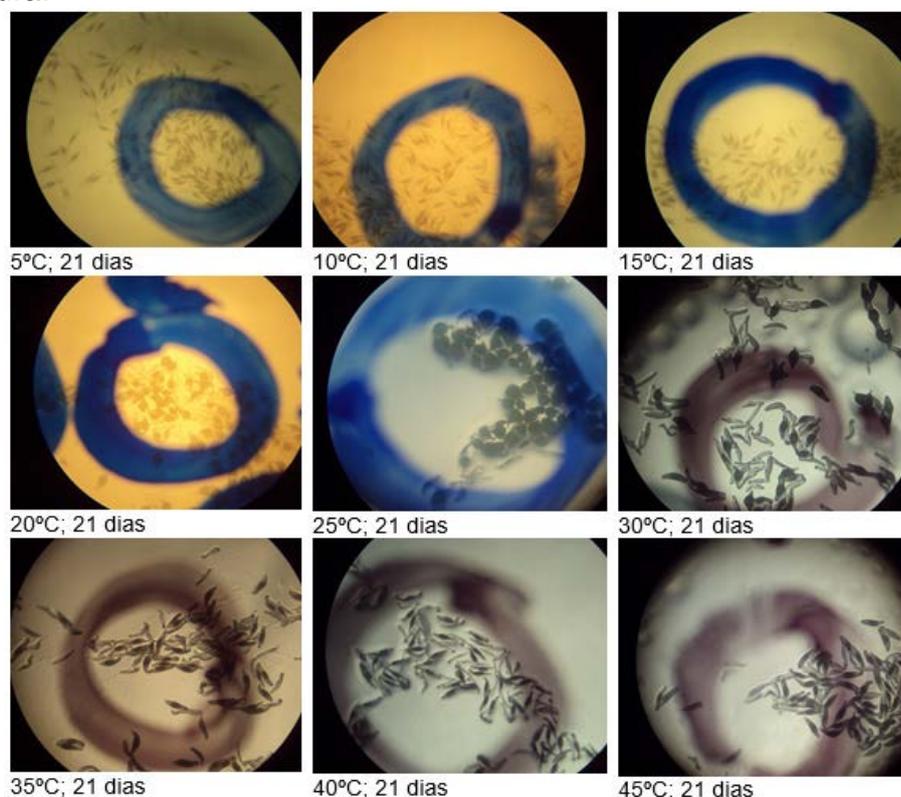
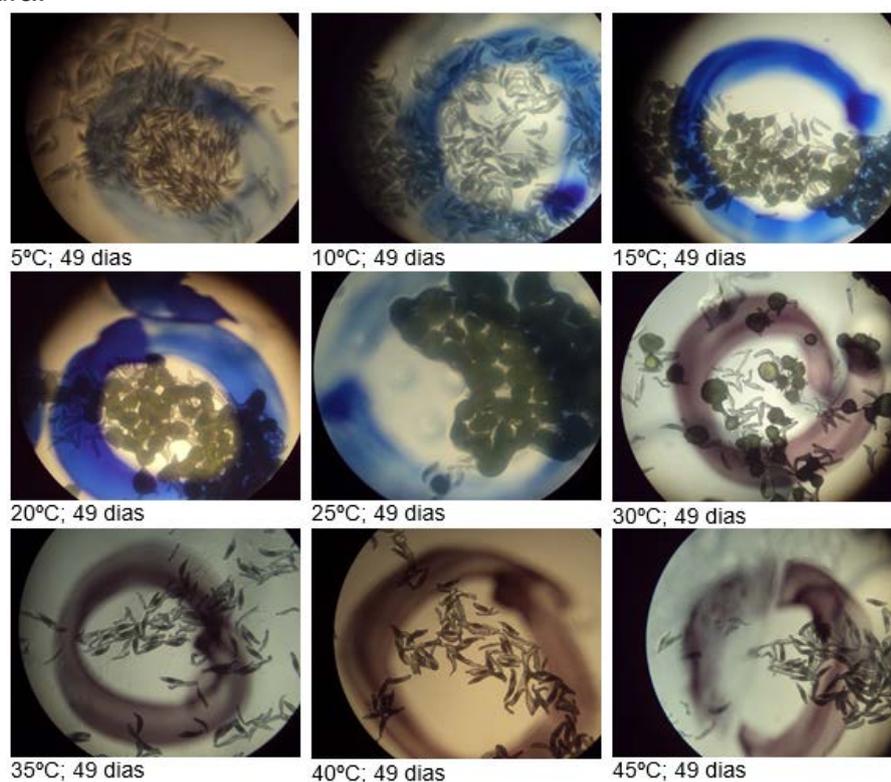


FIGURA 4.32 - Germinação assimbiótica de sementes de *Cattleya tigrina* em meio MS em diferentes temperaturas (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 °C), 49 dias após a semeadura.



O lote de sementes de *C. tenebrosa* exibiu o maior valor de germinação total (92,4%) e IVG (9,6) a 25 °C. O tempo médio de germinação para essa temperatura foi de 12,39 dias, com velocidade 0,08 e sincronismo de 1,45 (Tabela 4.13). Nas temperaturas de 10 e 15 °C houve uma distribuição assimétrica da germinação ao longo do tempo, com maiores tempo médio e distribuição polimodal das frequências. Laboriau; Agudo (1987) atribuíram um significado a este padrão de distribuição, indicando uma compensação das condições desfavoráveis de temperatura por uma maior distribuição da germinação no tempo (Figura 4.33). Essa irregularidade na germinação é positivamente relatada por Larcher (2000) pois, quando em condições naturais, as plântulas emergem em tempos diferentes e parte da progênie evita as condições climáticas mais desfavoráveis e uma herbivoria severa.

A espécie *C. tenebrosa* ocorre em florestas ombrófilas da Mata Atlântica nos estados de Minas Gerais, Espírito Santo e Rio de Janeiro, além do estado da Bahia. Para *C. tenebrosa* as temperaturas cardiais determinadas foram: temperatura mínima de 10 °C com 9,6% de germinação, temperatura ótima variando entre 20 e 25 °C – com germinação de 91,4% e 92,4%, respectivamente – e temperatura máxima de 30 °C, com 71,3% de germinação (Tabela 4.15).

TABELA 4.13 - Valores de Tempo médio, Velocidade de germinação, U-Sincronismo calculados a partir da germinação assimbiótica das sementes da orquídea *Cattleya tenebrosa*, em meio MS em diferentes temperaturas.

T (°C)	Tempo Médio	Velocidade	U
5	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
10	15,05±2,60	0,07±0,01	1,67±0,46
15	14,79±2,64	0,07±0,01	1,69±0,38
20	12,55±1,25	0,08±0,01	1,46±0,24
25	12,39±0,40	0,08±0,00	1,45±0,05
30	10,02±1,11	0,10±0,01	1,17±0,24
35	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
40	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
45	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00

Médias ± desvio padrão; T (°C) – temperatura em graus Celsius

FIGURA 4.33 - Frequências relativas de germinação das sementes de *Cattleya tenebrosa*, semeadas em meio MS em diferentes temperaturas: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 °C. As setas representam o tempo médio de germinação para cada temperatura (Gt- Porcentagem da germinação total, Tm-Tempo médio de germinação e U-Sincronismo na germinação).

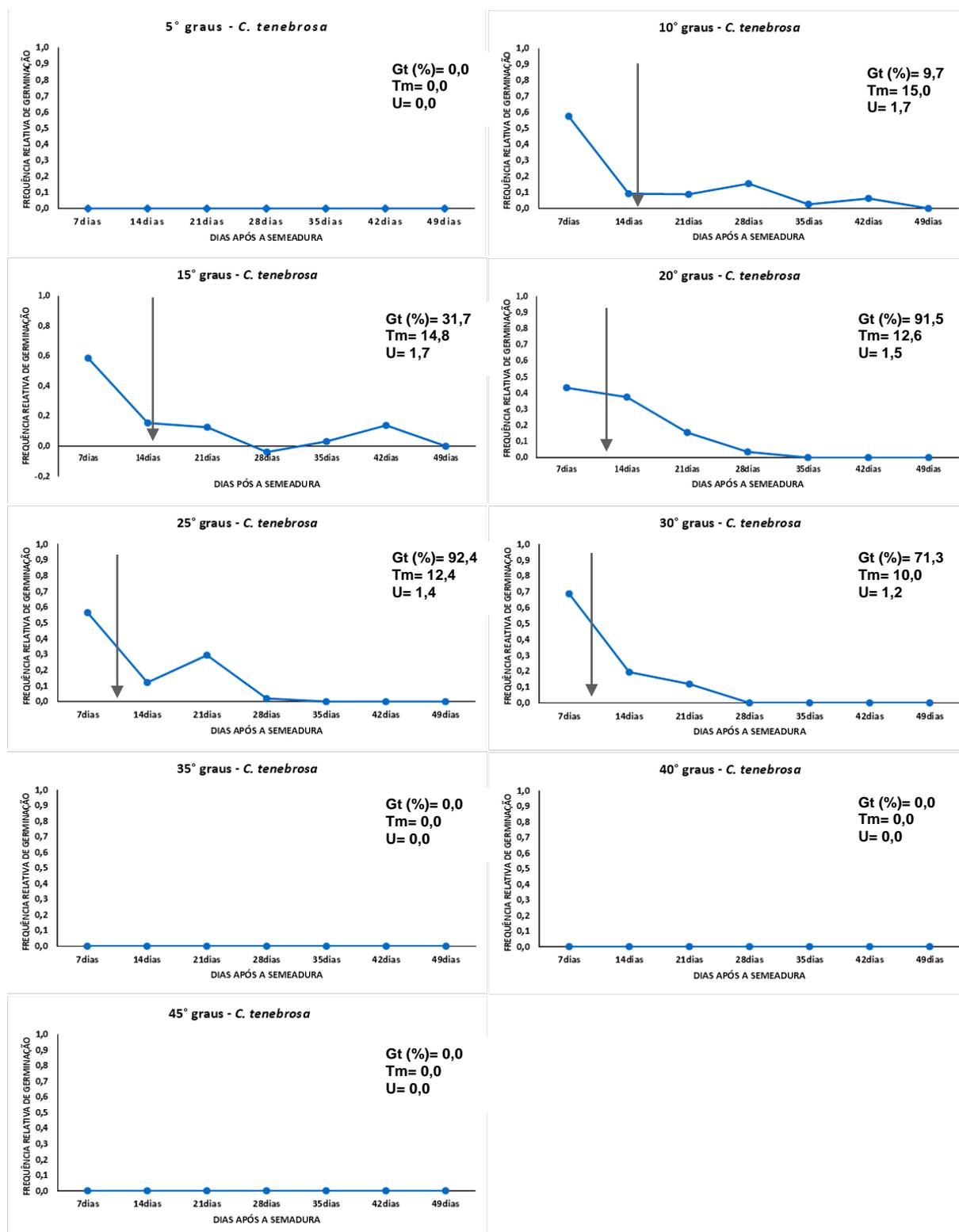


FIGURA 4.34 - Germinação assimbiótica de sementes de *Cattleya tenebrosa* em meio MS em diferentes temperaturas (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 °C), 21 dias após a sementeira.

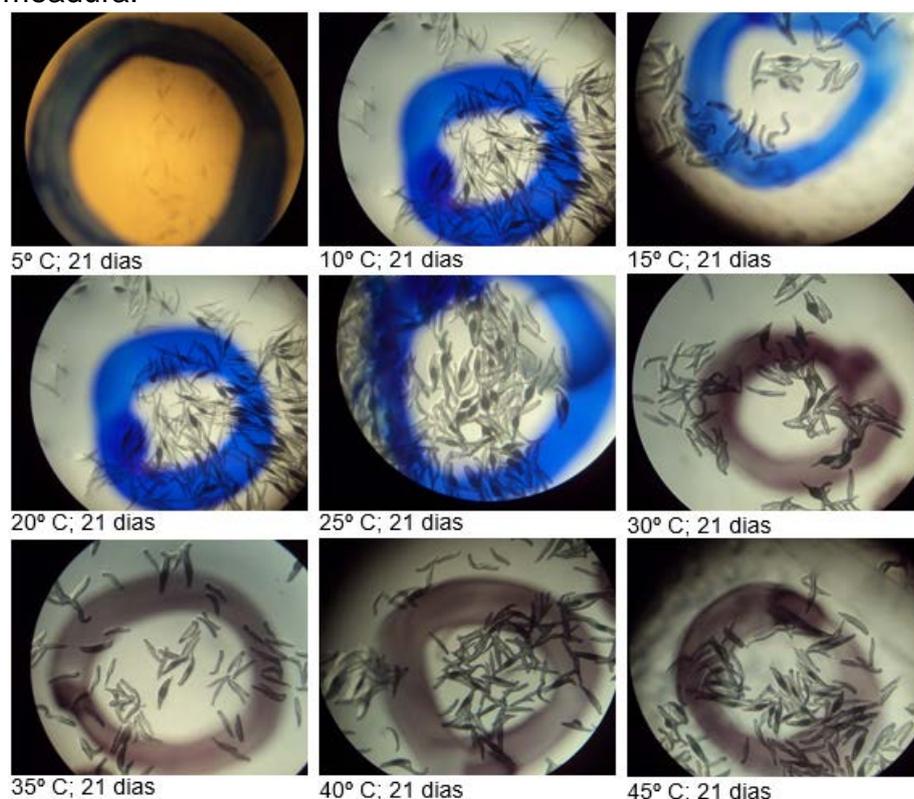
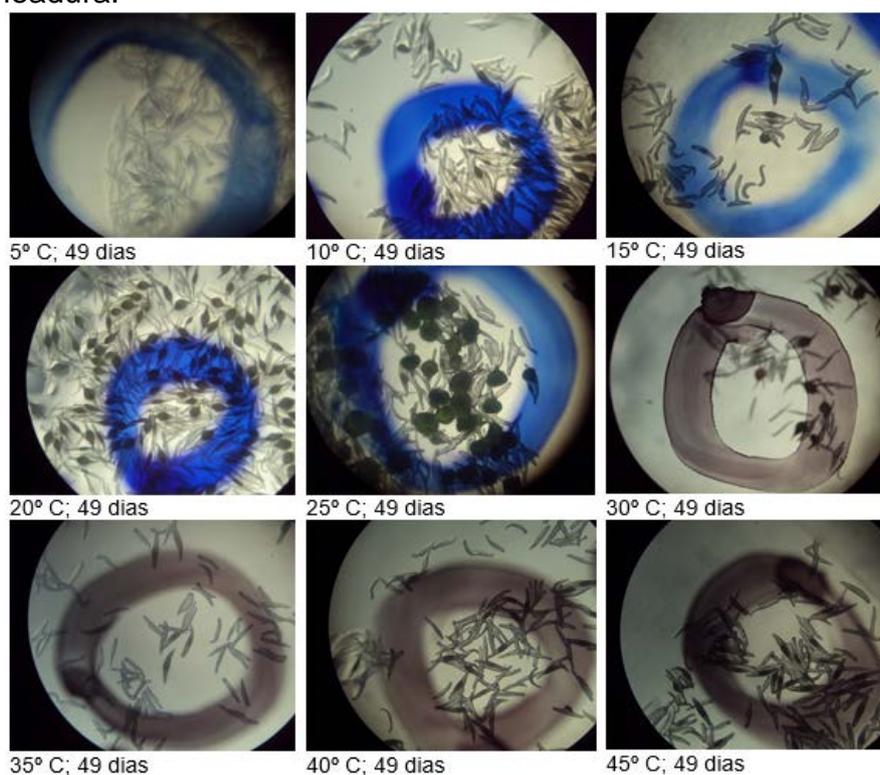


FIGURA 4.35 - Germinação assimbiótica de sementes de *Cattleya tenebrosa* em meio MS em diferentes temperaturas (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 °C), 49 dias após a sementeira.



Para as sementes de *C. intermedia* os valores de tempo médio de germinação, velocidade e sincronismo, assim como germinação total e IVG foram melhores e semelhantes nas temperaturas de germinação de 25 e 30 °C (Tabela 4.14).

A espécie *C. intermedia* ocorre em áreas da Floresta ombrófila da Mata Atlântica de todos os estados da região sul e também no estado de São Paulo. Para *C. intermedia* considerou-se a faixa entre 25 e 30° C como a temperatura ótima, uma vez que as taxas de germinação obtidas foram as mais altas, nos menores tempos médios – 97,2% e 7,8 dias a 25 °C e 96,55% e 7,4 dias a 30 °C. Estabeleceu-se 10 °C como sendo a temperatura mínima, com taxa de germinação de 79,8% e a máxima como o intervalo entre 30 e 35° C, uma vez que 30 °C compõe a faixa de temperatura ótima e a 35° C já não houve germinação (Tabela 4.15).

TABELA 4.14 - Valores de Tempo médio, Velocidade de germinação, U-Sincronismo calculados a partir da germinação assimiótica das sementes da orquídea *Cattleya intermedia*, em meio MS em diferentes temperaturas.

T (°C)	Tempo Médio	Velocidade	U
5	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
10	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
15	11,46±2,16	0,09±0,02	1,01±0,52
20	8,43±0,34	0,12±0,00	0,65±0,09
25	7,80±0,17	0,13±0,00	0,46±0,09
30	7,44±0,15	0,13±0,00	0,34±0,08
35	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
40	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
45	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00

Médias ± desvio padrão; T (°C) – temperatura em graus Celsius

FIGURA 4.36 - Frequências relativas de germinação das sementes de *Cattleya intermedia*, semeadas em meio MS em diferentes temperaturas: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 °C. As setas representam o tempo médio de germinação para cada temperatura (Gt- Porcentagem da germinação total, Tm-Tempo médio de germinação e U-Sincronismo na germinação).

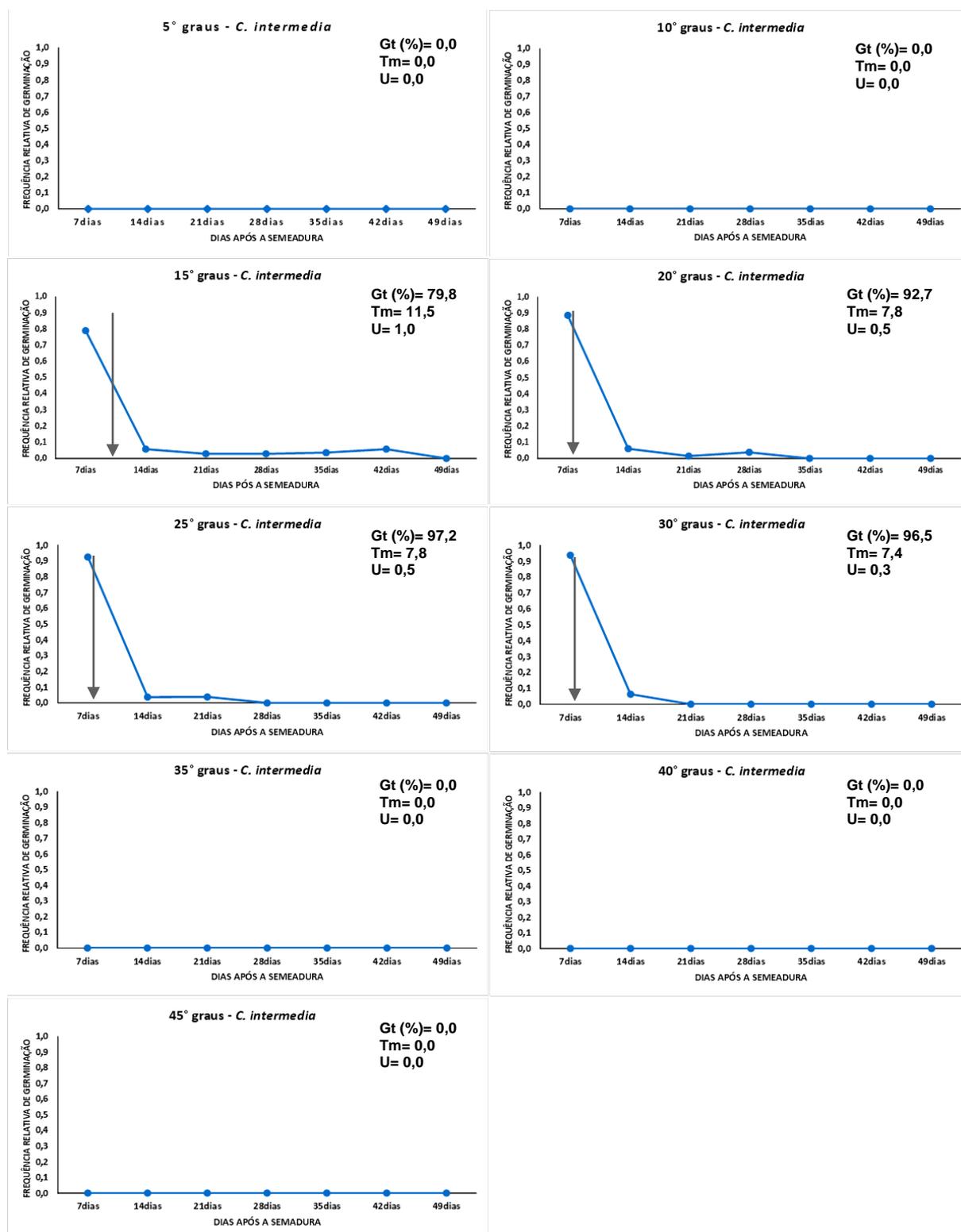


FIGURA 4.37 - Germinação assimbiótica de sementes de *Cattleya intermedia* em meio MS em diferentes temperaturas (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 °C), 21 dias após a semeadura.

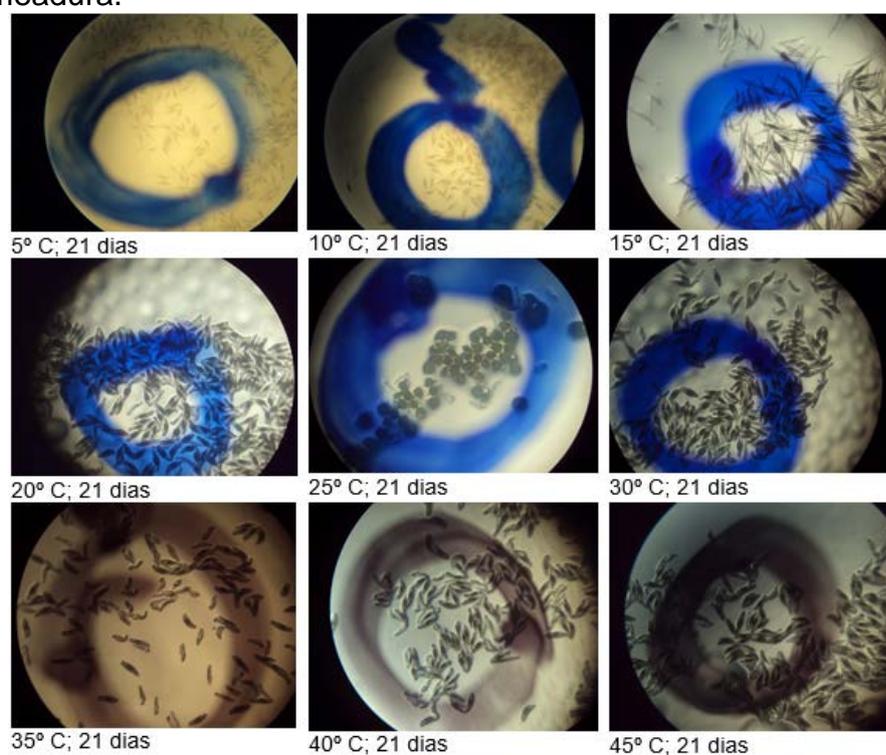
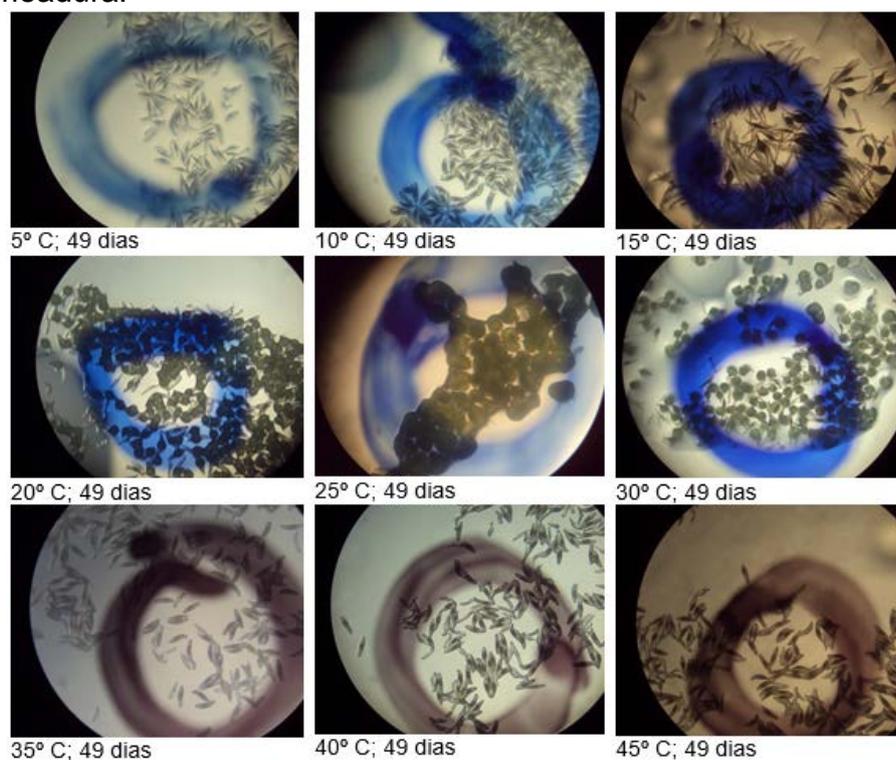


FIGURA 4.38 - Germinação assimbiótica de sementes de *Cattleya intermedia* em meio MS em diferentes temperaturas (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 °C), 49 dias após a semeadura.



As sementes da maioria das espécies de orquídeas germinam entre 6 e 40 °C, sendo a temperatura para a maior porcentagem de germinação *in vitro* normalmente entre 20 e 25 °C (ARDITTI; ERNST, 1984). No presente estudo foi possível determinar que para as orquídeas do gênero *Cattleya* a melhor faixa de temperatura situa-se entre 20 e 25 °C. Nas temperaturas acima e abaixo da ótima, a germinação foi menos sincronizada, com maiores valores de entropia e com tendência à distribuição polimodal da frequência relativa de germinação. Como observado por Ferraz-Grande e Takaki (2001), a distribuição da frequência de germinação tende a ser unimodal na temperatura ótima.

Ao longo da condução do experimento observou-se que temperaturas acima de 30 °C favorecem a evaporação mais rápida da água presente no meio de cultura MS, assim como maior condensação de água nas superfícies internas das placas, dificultando o registro fotográficos dos campos.

Já as temperaturas de 10 a 15 °C permitem a germinação, porém como a taxa metabólica das sementes é muito baixa nessas condições, a germinação apresenta uma distribuição maior ao longo do tempo, com um valor de germinação acumulada bastante baixo. Segundo Hendrick e Talorson (1976) as temperaturas baixas diminuem as taxas metabólicas até o ponto em que as vias essenciais ao início da germinação não podem mais operar, podendo da mesma maneira alterar o estado da membrana da fase líquido cristalino para cristalino. Este processo pode estar relacionado a características químicas, como as taxas de prolina e gordura ou à inativação de enzimas (ZHAO et al., 1994).

Um estudo realizado com diversas orquídeas revelou que as sementes de epífitas são mais hidrófilas que as terrestres e sugere que a capacidade de absorver a água rapidamente aumentaria a adesão da semente a substratos arbóreos, facilitando o início do processo de germinação assistida por fungos (YODER et al., 2010). Em temperaturas mais elevadas (acima de 35 °C), inicialmente as sementes apresentam rápido entumescimento e não germinam, dando origem ao protocormo, fase I da germinação, segundo Seaton e Hailes (1989) porém ocorre também uma deterioração acentuada do embrião, culminando com sua morte. Esse fato difere do que acontece em temperaturas abaixo de 10 °C, nas quais muitas sementes não germinam, mas as que o fazem mantêm embriões viáveis.

De acordo com Perez, Fanti e Casali (1998), espécies tropicais geralmente possuem um limite máximo acima de 35 °C, sendo sensíveis a baixas temperaturas, com limite mínimo acima de 5 °C. Segundo Bedi e Basra (1993), temperaturas baixas, próximas do ponto de congelamento, resultam em baixo estabelecimento de plântulas e em redução da biomassa, principalmente entre espécies tropicais ou subtropicais.

Por fim, em relação às frequências relativas de germinação, para uma determinação mais apurada do tempo médio parece ser aconselhável a contagem diária das germinações anteriormente ao 7º dia – e não a partir dele – uma vez que neste período a taxa de germinação já se apresenta elevada, como foi observado nas temperaturas entre 20 e 30 °C.

Em relação às temperaturas cardeais – temperatura mínima, temperatura ótima e temperatura máxima (Tabela 4.15) – a possibilidade de germinação na faixa entre 10 e 30 °C para a maioria das espécies analisadas permite supor que a temperatura por si só não deva constituir o único fator limitante para sua germinação no ambiente natural, considerando-se as amplitudes anuais de variação térmica registradas nos diferentes ambientes que colonizam.

TABELA 4.15 - Determinação da temperatura cardinal das sementes de orquídeas *Cattleya* germinadas em condições assimbiótica em meio de cultura MS.

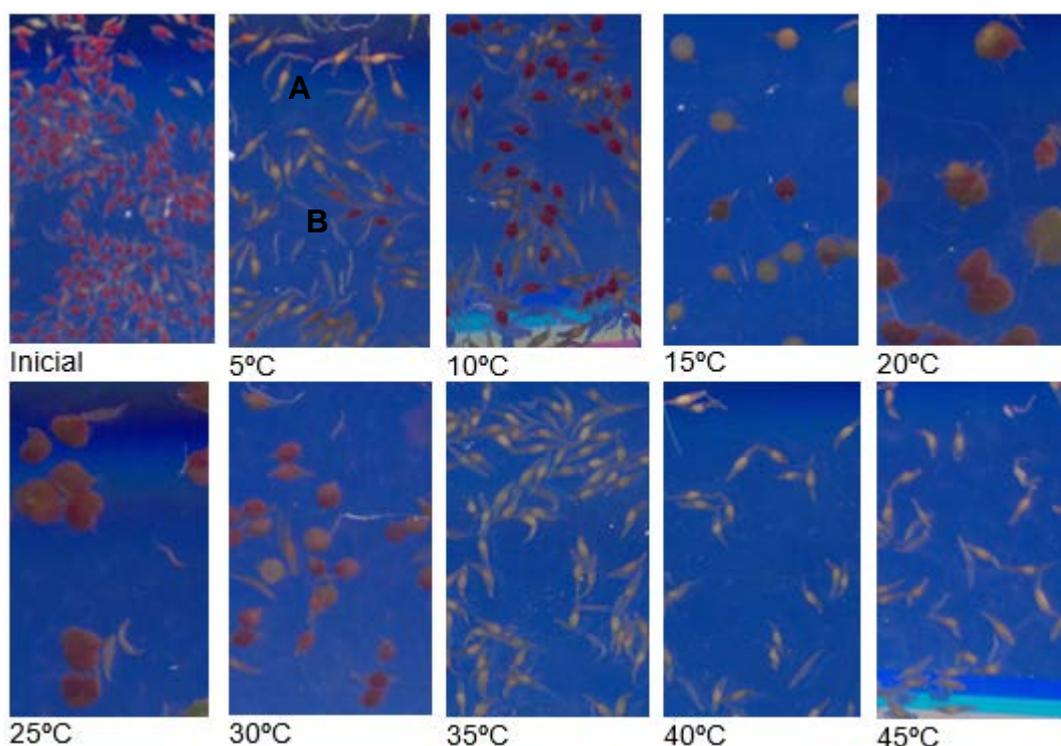
Amostra	Temperaturas cardeais (°C)		
	Tmin (Temperatura mínima)	To (Temperatura ótima)	TM (Temperatura máxima)
<i>Cattleya purpurata</i>	10	25	30
<i>Cattleya walkeriana</i>	10	25 ≤ To ≤ 30	30 < TM < 35
<i>Cattleya warneri</i>	15	25	30
<i>Cattleya labiata</i>	15	25 ≤ To ≤ 30	30 < TM < 35
<i>Cattleya amethystoglossa</i>	15	20 ≤ To ≤ 25	30
<i>Cattleya lodigesii</i>	15	25	30
<i>Cattleya brevicaulis</i>	10	25 ≤ To ≤ 30	30 < TM < 35
<i>Cattleya jongheana</i>	10	20 ≤ To ≤ 25	30
<i>Cattleya schilleriana</i>	10	25 ≤ To ≤ 30	30 < TM < 35
<i>Cattleya tigrina</i>	15	20 ≤ To ≤ 25	30
<i>Cattleya tenebrosa</i>	10	20 ≤ To ≤ 25	30
<i>Cattleya intermedia</i>	10	25 ≤ To ≤ 30	30 < TM < 35

O teste de tetrazólio foi realizado antes do processo de germinação para verificar a viabilidade das sementes para o experimento. Todos os lotes apresentaram valores altos de viabilidade: *C. purpurata* (94,0%), *C. tigrina* (98,0%), *C. walkeriana* (95,5%), *C. warneri* (93,3%), *C. labiata* (96,1%), *C. amethystoglossa*

(92,6%), *C. lodigesii* (97,7%), *C. brevicaulis* (89,8%), *C. jongheana* (97,6%), *C. schilleriana* (94,4%), *C. leopoldii* (95,8%), *C. tenebrosa* (92,0%), *C. intermedia* (96,1%).

Logo após o período de germinação, quarenta e nove dias após a sementeira, as sementes e protocormos presentes no meio de cultura MS nas placas de Petri, foram colocados em microtubos para verificar a presença de sementes dormentes, sementes mortas e sementes germinadas. Esse procedimento foi realizado com apenas cinco amostras, pois não estava previsto no ensaio e não era um objetivo do trabalho. Na Figura 4.39 observa-se protocormos, sementes viáveis e sementes inviáveis de *C. brevicaulis* nos ensaios referentes à faixa de 10 a 30 °C. Já a 5 °C observa-se apenas sementes viáveis e inviáveis e nas temperaturas de 35, 40 e 45 °C todas as sementes se mostram inviáveis.

FIGURA 4.39 - Sementes e protocormos de *Cattleya brevicaulis*, submetidas ao teste de tetrazólio antes e após o período de germinação assimbiótico em meio MS em diferentes temperaturas. A- sementes não viáveis (coloração branca) e B- sementes viáveis (coloração vermelha).



Analisando os resultados da viabilidade do teste de tetrazólio, foi possível verificar que as sementes mantidas no meio de cultura MS após a sementeira e mantidas em temperaturas acima de 35 °C não germinam e perdem

100% da viabilidade. Segundo Bewley e Black (2013) as sementes tendem a perder sua viabilidade quando mantidas em altas temperaturas e umidade. No caso do experimento, a alta umidade foi proporcionada pela presença do meio de cultura MS.

Em relação à temperatura de 5 °C, na qual não ocorreu germinação das sementes analisadas, as espécies *C. purpurata*, *C. labiata* e *C. brevicaulis* apresentaram sementes ainda viáveis, enquanto as sementes de *C. walkeriana* e *C. warneri* não resistiram à baixa temperatura, apresentando-se inviáveis 97,9% e 100,0% respectivamente (Tabela 4.16). Para os valores de temperatura de germinação entre 10 e 30 °C a perda da viabilidade detectada pelo teste de tetrazólio decresceu, pois aumentou o número de sementes germinadas (Figura 4.39).

TABELA 4.16 - Viabilidade das sementes pelo teste de tetrazólio em porcentagem (%) antes da germinação assimbiótica (início) e logo após o período de 49 dias de germinação assimbiótica em meio MS e em diferentes temperaturas.

amostra	Temperaturas de germinação assimbiótica (°C)									
	Sementes viáveis inicial (%)	5	10	15	20	25	30	35	40	45
	Sementes mortas após o período de germinação (%)									
235	94,0±2,1	66,9±7,8	33,3±7,5	19,1±2,0	7,1±1,7	9,3±1,8	39,5±7,8	100,0	100,0	100,0
301	95,5±0,9	81,3±7,1	47,5±4,6	3,0±0,8	2,7±1,3	4,5±1,1	4,3±0,3	100,0	100,0	100,0
309	93,3±3,3	97,9±1,1	96,4±3,6	62,5±6,5	32,7±3,4	37,8±5,7	34,7±3,3	100,0	100,0	100,0
314	96,1±1,8	100,0	93,8±1,6	9,1±2,3	6,3±1,7	5,7±1,4	50,0±3,4	100,0	100,0	100,0
344	89,8±0,6	76,3±5,6	38,0±2,1	4,2±1,2	0,0	6,3±3,2	3,3±1,4	100,0	100,0	100,0

235 – *C. purpurata*; 301 – *C. walkeriana*; 309 – *C. warneri*; 314 – *C. labiata*; 344 – *C. brevicaulis*.

Após o período de germinação, a porcentagem de sementes mortas de *C. warneri* nas temperaturas entre 15 e 25 °C se mostrou superior em relação às outras espécies, o que pode estar relacionado também aos baixos valores de germinação obtidos (Tabela 4.16). Foi possível verificar que parte das sementes não germinadas a 5 e 30 °C ainda apresentava viabilidade, indicando um possível estado de dormência (JOHNSON; KANE; PÉREZ, 2011).

O aumento da temperatura global poderá resultar em uma migração gradual das zonas de vegetação de forma altitudinal e/ou latitudinalmente. As

orquídeas em dosséis florestais poderão ser excepcionalmente sensíveis à dessecação e também poderão ser afetadas indiretamente por conta das complexas redes de interação com outras epífitas e com os estágios fenológicos e polinizadores (MARENGO, 2006).

Sementes de orquídeas germinam em ampla faixa de temperatura, entretanto verificou-se no presente trabalho que temperaturas acima de 30 °C prejudicam não só a porcentagem de germinação como a velocidade de germinação, o IVG, o sincronismo e o tempo médio de germinação. Assim, em possíveis cenários de aumento de temperatura, poderão ocorrer reduções na qualidade da germinação das sementes, com consequente atraso na emergência dos protocormos, afetando seu estabelecimento.

4.5 Conclusões

A melhor temperatura para a germinação assimbiótica das espécies *C. purpurata*, *C. lodigesii* e *C. warneri* é de 25 °C. Para *C. amethystoglossa*, *C. jongheana*, *C. tigrina* e *C. tenebrosa*, a melhor temperatura situa-se entre 20 e 25 °C. Para *C. walkeriana*, *C. labiata*, *C. brevicaulis*, *C. schilleriana* e *C. intermedia* encontra-se entre 25 e 30 °C. Nestas faixas de temperatura obtêm-se os maiores valores de germinação acumulada, os menores tempos médios e melhores valores de sincronismo. As temperaturas de 5 e 10 °C permitem a viabilidade das sementes mesmo após o período de germinação enquanto as temperaturas de 35, 40 e 45° C não permitem a germinação e ainda levam os embriões à morte.

REFERÊNCIAS

ARDITTI, J.; ERNST, R. **Physiology of germinating orchid seeds**. In **Orchid biology: reviews and perspectives III**. Ithaca: Cornell University Press, 1984. p.177–222.

ALVARADO, V.; BRADFORD, J. K. A hydrothermal time model explains the cardinal temperatures for seed germination. **Plant, Cell & Environment**, v. 25, n. 9, p. 1061-1071. 2002.

ANDRADE, A.C.S. et al. Substrato, temperatura de germinação e desenvolvimento pós seminal de sementes de *Dalbergia nigra*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.3, p.517-523, 2006.

BARROS, F. et al. **Orchidaceae** in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB11329>>. Acesso em: 10 Out. 2016.

BEDI, S.; BASRA, A.S. Chilling injury in germinating seeds: basic mechanisms and agricultural implications. **Seed Science Research**, v.3, n.4, p.219- 229, 1993.

BEWLEY, J.D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. New York: Plenum Press, 2013. 392 p.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Instrução normativa n.6, de 23 de setembro de 2008. Lista Oficial das Espécies da Flora Ameaçada de Extinção (Anexo I) e Lista Oficial da Flora Brasileira com Deficiências de Dados. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 24 set. 2008. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/estruturas/ascom_boletins/_arquivos/83_19092008034949.pdf>. Acesso em: 16 jan. 2015.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Portaria n.443, de 17 de dezembro de 2014. Lista Nacional Oficial de Espécies da Flora Ameaçadas de Extinção (Anexo). **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 18 dez. 2014. Disponível em: <<http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?data=18/12/2014&jornal=1&pagina=110&totalArquivos=144>>. Acesso em: 10 out. 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 2009.

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

CARVALHO, P.G.B. et al. Temperature dependent germination and endo-b-mannanase activity in sesame seeds. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.13, n.2, p.139-148, 2001.

CASTRO, R.D.; BRADFORD, K.; HILHORST, H. Embebição e reativação do metabolismo. In: FERREIRA, F.G.; BORGHETTI, F. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p.149-162.

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

CONSEMA. Resolução CONSEMA - 51 Lista Oficial das Espécies da Flora Ameaçadas de Extinção do Estado de Santa Catarina. **Diário Oficial**. Florianópolis, SC, 23 dez. 2014. p.19. Disponível em: http://imprensaoficial.com.br/PortalIO/DO/BuscaDO2001Documento_11_4.aspx?link=/2004/executivo%20secao%20i/setembro/22/Pag_0026.pdf&pagina=26&data=22/09/2004&caderno=Executivo I. Acesso em: 15 mar. 2015.

COPAM. Deliberação COPAM, no. 85. Lista das Espécies Ameaçadas de Extinção da Flora do Estado de Minas Gerais. **Diário Oficial**. Belo horizonte, MG, 21 out. 1997. Disponível em: <http://www.siam.mg.gov.br/sla/download.pdf?idNorma=5483>>. Acesso em: 10 out. 2016.

CNCFLORA. *Cattleya* in Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012.2 Centro Nacional de Conservação da Flora. Disponível em <http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Cattleya>>. Acesso em: 10 out. 2016.

COWAN, R.S. et al. 300 000 species to identify: problems, progress, and prospects in DNA barcoding of land plants. **Taxon**, v.55, p. 611-616, 2006.

CUSTÓDIO, C.C. et al. Improved tetrazolium viability testing in orchid seeds with a thick carapace (*Dactylorhiza fuchsii*) or dark seed coat (*Vanda curvifolia*). **Seed Science and Technology**, v.44, n.1, p.177-188, 2016.

DEEN, W.; HUNT, T.; SWANTON, J. C. Influence of temperature, photoperiod, and irradiance on the phenological development of common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia*). **Weed Science**, v. 46, n. 4, p. 555-560, 1998.

FERRAZ-GRANDE, F. G. A.; TAKAKI, M. Temperature dependente seed germination of *Dalbergia nigra* Allem (Leguminosae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.44, n.4, p.401-404, 2001.

FORZZA, R.C. et al. **Angiospermas in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2013. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB128482>>. Acesso em: 01 jul. 2014.

FOWLIE, J.A. **The Brazilian bifoliate Cattleyas and their color varieties**. Pomona, California: Azul Quinta Press, 1997. 132p.

GRUNDY, C.A.; MEAD, A. Modeling weed emergence as a function of meteorological records. **Weed Science**, v. 48, n. 5, p. 594-603, 2000.

HENDRICKS, S.B.; TAYLORSON, R.B. Variation in germination and aminoacid leakage of seeds with temperature related to membrane phase change. **Plant Physiology**, v.58, n.1, p.7-11, 1976.

HOSOMI, S.T. et al. Pre-conditioning *Cattleya* seeds to improve the efficacy of the tetrazolium test for viability. **Seed Science and Technology**, v. 139, p. 178-189, 2011.

HOSOMI, S.T. et al. Improved assessment of viability and germination of *Cattleya* (Orchidaceae) seeds following storage. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 48, p. 127–136, 2012.

JOHNSON, T.R.; KANE, M.E.; PÉREZ, H.E. Examining the interaction of light, nutrients and carbohydrates on seed germination and early seedling development of *Bletia purpurea* (Orchidaceae) **Plant Growth Regulation**, v.63, p. 89–99, 2011.

KOPOWITZ, H. **Orchids and their conservation**. Timber Press, 2001. 176p.

LABOURIAU, L.G.; VALADARES, M.E.B. On the germination of seeds *Calotropis procera* (Ait.) Ait.f. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.48, n.2, p.263-284, 1976.

LABOURIAU, L.G.; PACHECO, A. On the frequency of isothermal germination in seeds of *Dolichos biflorus* L. **Plant and Cell Physiology**, Tokyo, v.19, n.3, p.507-512, 1978.

LABOURIAU, L.G. **A germinação das sementes**. Washington: Secretaria da OEA, 1983. 173p.

LABOURIAU, L.G.; AGUDO, M. On the physiology of germination in *Salvia hispanica* L. Temperature effects. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.59, n.1, p.37-56, 1987.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: Rima, 2000. 531p.

LEE, Y.I. et al. Embryology of *Phalaenopsis amabilis* var. *formosa*: embryo development. **Botanical Studies**, v.49, p.139–146, 2008.

LEBLANC, L. M. et al. The use of thermal time to model common lambsquarters (*Chenopodium album*) seedling emergence in corn. **Weed Science**, v. 51, n. 5, p. 718-724, 2003.

MACHADO NETO, N.B.; CUSTÓDIO, C.C. A medium for non-commercial sowing of orchid seed. **Selbyana**, v. 26, n.1-2, p. 316-317, 2005.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination aid in selection and evaluation of seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v. 2, n. 1, p. 176-177, 1962.

MARCOS-FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: FEALQ, 2005. 495p.

MARENGO, J. A. Mudanças climáticas e seus efeitos sobre a biodiversidade: caracterização do clima atual e definição das alterações climáticas para o território brasileiro ao longo do século XXI. Brasília, DF: Ministério do Meio Ambiente, **Biodiversidade**, v. 26, p. 159, 2006.

MAYER, A.M.; POLJAKOFF-MAYBER, A. **The germination of seeds**. New York: Pergamon Press, 1989. 270p.

MEDEIROS-SILVA, L.M.; RODRIGUES, T.J.D.; AGUIAR, I.B. Efeito da luz e da temperatura na germinação de sementes de aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Allemão). **Revista Árvore**, v.26, n.6, p.691-697, 2002.

NASCIMENTO, W.M. Condicionamento osmótico de sementes de hortaliças visando a germinação em condições de temperaturas baixas. **Horticultura Brasileira**, v. 23, n. 2, p. 211-214, 2005.

PEREZ, S.C.J.G.A.; FANTI, S.C.; CASALI, C.A. Limites de temperatura e estresse térmico na germinação de sementes de *Peltophorum dubium* (Spreng) Taubert. **Revista Brasileira de Sementes**, v.20, n.1, p.134-142, 1998.

PIMM, S.L. et al. How many endangered species remain to be discovered in Brazil? **Natureza & Conservação**, v.8, p.71-77, 2010.

ROMAN, E. S. et al. Modeling germination and elongation of common lambsquarters (*Chenopodium album*). **Weed Science**, v. 47, n. 1, p. 149-155, 1999.

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 en management**. Cambridge: University Press, 1989. p. 17-29.

SEATON, P.T. et al. Ex situ conservation of orchids in a warming world. **Botanical Review**. v. 76, p. 193–203, 2010.

SEMA. Decreto no. 52.109. Lista da Flora Ameaçada de Extinção do Rio Grande do Sul. **Diário Oficial**. Porto Alegre, RS, 02 dez. 2014. Disponível em: <<http://www.fzb.rs.gov.br/upload/20141222103647doe.pdf>>. Acesso em: 15 out. 2016.

SMA-SP. Resolução SMA - 57 Lista Oficial das Espécies da Flora do Estado de São Paulo Ameaçadas de Extinção. **Diário Oficial**. São Paulo, SP, 05 jun. 2016. p. 69-71. Disponível em: http://www.ambiente.sp.gov.br/wp-content/uploads/2016/06/pg_0073.pdf. Acesso em: 12 out. 2016.

SIMONELLI, M.; FRAGA, C. N. (orgs.). **Espécies da flora ameaçadas de extinção no estado do Espírito Santo**. Vitória: Ipema, 2007.

SOCOLOWSKI, F.; TAKAKI, M. Germination of *Jacaranda mimosifolia* (D. Don - Bignoniaceae) seeds: effects of light, temperature and water stress. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.47, n.5, p.785-792, 2004.

STECKEL, E. L.; SPRAGUE, L. C.; STOLLER, W. E. Temperature effects on germination of nine *Amaranthus* species. **Weed Science**, v. 52, n. 2, p. 217-221, 2004.

SWARTS N. D.; DIXON K. W. Terrestrial orchid conservation in the age of extinction. **Annals of Botany**, v. 104, p. 543–556, 2009.

THOMPSON, K.; GRIME, J.P.; MASON, G. Seed germination in response to diurnal fluctuations of temperature. **Nature**, v.267, p.147-149, 1977.

VAN DEN BERG, C. Reaching a compromise between conflicting nuclear and plastid phylogenetic trees: a new classification for the genus *Cattleya* (Epidendreae; Epidendroideae; Orchidaceae). **Phytotaxa** v. 186, n. 2, p.075–086, 2014.

VAN DEN BERG, C. *Cattleya* in **Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2016. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br /reflora/floradobrasil/FB11347>>. Acesso em: 14 out. 2016

YAM, T.W.; ARDITTI, J.; CAMERON, K.M. The Orchids have been a splendid sport — an alternative look at Charles Darwin's contribution to orchid biology. **American Journal of Botany**, v.96, p. 2128–2154, 2009.

YODER, J.A., et al. Comparative water balance profiles of Orchidaceae seeds for epiphytic and terrestrial taxa endemic to North America. **Plant Ecology**, v. 211, n.1, p. 7–17, 2010.

WITHNER, C.L. **The *Cattleyas* and their relatives. I. The *Cattleyas***. Portland, Oregon: Timber Press, 1988. 147p.

ZHAO, Y.T.; CHANG, R.Z.; LI, Y.J. et al. Relationship between physical characters, chemical composition, germination and cold-tolerance in soybean. **Chinese Journal of Botany**, v.6, n.1, p.60-63, 1994.

CONCLUSÕES GERAIS

O presente estudo permitiu concluir que a conservação *ex situ* de orquídeas através de bancos de sementes constitui-se uma ferramenta bastante econômica, por não necessitar de grandes espaços e investimentos. Entretanto, ainda faltam estudos para determinar o número de espécies tolerantes ao frio e dessecação. Dessa forma, para a conservação das espécies de orquídeas é necessário alinhar todas as formas de conservação *in situ* e *ex situ*, de modo a promover a preservação da diversidade.

O resultado do teste de tetrazólio de sementes de orquídeas de *Cattleya tigrina* e *C. labiata* pré-condicionadas em solução de glicose 10% e sacarose 10% mostrou-se adequado para a identificação das sementes viáveis. O uso de solução tampão na diluição do sal de tetrazólio não apresentou diferença em relação à diluição em água. Os valores de viabilidade mais elevados foram detectados para ambas as amostras de sementes quando o teste foi realizado com solução de tetrazólio a 1,0%, durante 24 horas.

O teste de tetrazólio mostrou-se eficiente para determinar a qualidade fisiológica das 36 amostras de sementes de orquídeas do gênero *Cattleya* testadas, possibilitando sua classificação das sementes de orquídeas como ortodoxas de vida média à longa.

Por fim, concluiu-se que sementes de *Cattleya* comportam-se como sementes de plantas tropicais, apresentando uma faixa ótima de temperatura de germinação entre 20 e 30 °C. Sementes submetidas à germinação nas temperaturas de 5 e 10 °C apresentaram-se viáveis. Já a germinação a 35, 40 e 45° C não ocorreu e ainda levou os embriões à morte.

REFERÊNCIAS GERAIS

ASHMORE S. E.; HAMILTON K. N.; OFFORD C. A. Conservation technologies for safeguarding and restoring threatened flora: case studies from Eastern Australia. **In Vitro Cellular Development Biology – Plant**, v. 47, n. 1. p. 99-109, 2011.

HOSOMI S.T. et al. Pre-conditioning *Cattleya* seeds to improve the efficacy of the tetrazolium test for viability. **Seed Science and Technology**, v. 139, p.178-189, 2011.

MIRENDA, T.J. Botanic gardens, education and conservation Strategies: The need for a coordinated approach. **Lankesteriana**, v. 11, n. 3, p. 301-305, 2011.

SEATON, P.T. et al. Ex situ conservation of orchids in a warming world. **Botanical Review**, v. 76, p. 193–203. 2010.

SEATON, P.T.; PRITCHARD, H.W. Orchid Seed for Sustainable Use: A model for future seed banking activities. **Lankesteriana**, v. 11, n. 3, p. 349-353, 2011.