

**GERMINAÇÃO, VIABILIDADE E ARMAZENAMENTO DE SEMENTES  
DE *Cattleya* (ORCHIDACEAE)**

**SILVÉRIO TAKAO HOSOMI**

**GERMINAÇÃO, VIABILIDADE E ARMAZENAMENTO DE SEMENTES  
DE *Cattleya* (ORCHIDACEAE)**

**SILVÉRIO TAKAO HOSOMI**

Dissertação apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Agronomia

Área de Concentração: Produção Vegetal

Orientadora:  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ceci Castilho Custódio

631.521  
H827g

Hosomi, Silvério Takao.

Germinação, Viabilidade e Armazenamento de Sementes de *Cattleya* (Ochidaceae) / Silvério Takao Hosomi. – Presidente Prudente: [s.n.], 2009.

57 : il.

Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE: Presidente Prudente – SP, 2009.

Bibliografia

1. Germinação -- Testes. 2. Tetrazólio – Testes. 3. Sementes -- Conservação. I. Título.

**SILVÉRIO TAKAO HOSOMI**

**Germinação, Viabilidade e Armazenamento de Sementes de  
*Cattleya* (ORCHIDACEAE)**

Dissertação apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Agronomia

Presidente Prudente, 23 de junho 2009.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ceci Castilho Custódio  
Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE,  
Presidente Prudente - SP.

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Claudia Pacheco Santos  
Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE,  
Presidente Prudente - SP.

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Auxiliadora M. Gutierrez  
Universidade Estadual de Maringá – UEM  
Maringá – PR.

## AGRADECIMENTOS

*À minha orientadora, Prof<sup>ª</sup>. Dra. Ceci Castilho Custódio, que esteve presente desde meu primeiro contato com o curso até a apresentação da dissertação, mostrando-se sempre atenciosa e competente.*

*Ao Prof. Dr. Nelson Barbosa Machado, pela amizade e grande conhecimento, que muito contribuíram para a realização deste trabalho.*

*Ao professor e colega de trabalho Prof. Dr. Gustavo Maia Souza, pelo incentivo e por me apresentar ao curso de Pós-Graduação em Agronomia.*

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

*À Keid Ribeiro Kruger, que estando à frente da secretaria tornou a burocracia menos burocrática.*

*Aos funcionários dos laboratórios: Sementes, Cultura de Tecidos Vegetais e Genética Molecular da UNOESTE.*

*Aos colegas de curso: Paulo, Miléia, Dani, Daniela, Júlio, Fábio, Diego, Luciana, Maura, Gabriel, Miriam, Luiz Guilherme, Edson, Keila, Sato e Gilson pela companhia nas aulas e distração nos horários de cafezinho.*

*À aluna de graduação do curso de Agronomia da Unoeste, Renata Batista dos Santos, por ter auxiliado nas contagens de sementes dos experimentos iniciais.*

*Aos alunos dos cursos de Agronomia e Ciências Biológicas da Unoeste (Ricardo, Natália, Massako, Toddy, Érica), pela companhia e disposição em aplicar os conhecimentos que adquiri nos experimentos realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos.*

*À Direção da Faclepp - Faculdade de Ciências Letras e Educação de Presidente Prudente e, em especial, à Coordenadora do Curso de Ciências Biológicas da UNOESTE, Profa. Aparecida Carmen Terazaki, por incentivar a qualificação do corpo docente.*

*À Darwin Initiative - Orchid Seed Storage Sustainable Use (OSSSU Project), uma parceria entre o Royal Botanic Gardens – Kew e a UNOESTE, que permitiu a execução deste trabalho.*

*Ao pesquisador do Royal Botanic Gardens - Kew, Phillip Seaton, por ter me ajudado a entender melhor a importância das pesquisas na área da conservação de orquídeas.*

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho ao casal de professores e pesquisadores Nelson Barbosa Machado Neto e Ceci Castilho Custódio que são os verdadeiros idealizadores deste trabalho e por isso merecem receber todos os frutos e sementes (méritos) desta obra.*

*À minha família (Glenda, Bia, Shindi e Dani) que entendeu minha ausência na correria do dia-a-dia. E se eu sempre estive com disposição e humor para o trabalho no laboratório é porque alguém, em casa, teve que conviver com o outro lado.*

“Qualquer fenômeno biológico só tem sentido quando interpretado sob a perspectiva evolucionista da seleção natural, caso contrário não terá sentido nenhum.”

Theodosius Dobzanski

## RESUMO

### **Germinação, Viabilidade e Armazenamento de Sementes de *Cattleya* (Ochidaceae)**

Sementes extremamente pequenas, associação obrigatória com micorrizas para germinação natural e processos de polinização especializados são algumas características comuns entre as orquídeas, grupo morfológicamente heterogêneo que constitui a maior família de plantas entre as Angiospermas. A degradação de ambientes naturais pela ação humana tem levado um grande número de espécies deste grupo à extinção; o que torna a formação de um banco de sementes uma estratégia de preservação interessante. Desta forma, estudos para entender o comportamento das sementes quanto à perda da viabilidade durante o armazenamento e o uso de testes rápidos para a avaliação da viabilidade das mesmas acabam tornando-se ferramentas importantes. A popularização dos equipamentos de informática e softwares possibilita o uso de análises de imagens através da digitalização dos testes de germinação e tetrazólio, uma alternativa interessante que permite que pequenos produtores auxiliem no processo de conservação das espécies de orquídeas. Na primeira parte deste trabalho realizou-se a análise das sementes de *Cattleya* pré-condicionadas em solução de sacarose e posteriormente submetidas a concentrações distintas de sais tetrazólio, em diferentes tempos de exposição, para avaliar a qualidade fisiológica das sementes. Na segunda parte, dez lotes de sementes foram armazenados em baixa temperatura e suas viabilidades foram avaliadas pelos testes de germinação e tetrazólio. A análise da viabilidade das sementes submetidas aos testes de tetrazólio e germinação através da digitalização de imagens mostrou-se eficiente tanto pela praticidade como pela possibilidade de controle das contagens. O pré-condicionamento em solução de sacarose 10% apresentou melhores resultados, facilitando a identificação das sementes viáveis e soluções de tetrazólio com concentrações acima de 0,25% e períodos de exposição ao tetrazólio superiores à 6 horas seriam as mais recomendadas. Os resultados demonstraram não haver perda na viabilidade das sementes armazenadas e em cinco lotes houve diminuição do IVG e foi alta a correlação entre os testes de tetrazólio com pré-condicionamento em solução de sacarose e a germinação.

Palavras chave: Germinação -- Testes. Tetrazólio – Testes. Sementes --  
Conservação. Análise de imagens

## ABSTRACT

### **Germination, viability and storage of *Cattleya* seeds (Orchidaceae)**

Seeds with extremely reduced size, obligatory association with micorrhizal fungi for natural germination and specialized pollination procedures are similar characteristics among orchids, a morphologic heterogeneous group that constitutes the biggest family of plants. The natural environment destruction by men action has pushed a great number of species near to extinction, which makes the stablishment of seed banks an interesting preservation strategy. Therefore, studies for understanding seed behavior and viability loss during storage and the use of quick tests for the evaluation of seed viability had become important tools. The popularization of info equipment and software would permit the use of image analysis through digitalization of germination and tetrazolium tests, an interesting alternative that will allows small producers to contribute to orchid species conservation. In the first part of this work, an analysis of sucrose pre conditioned *Cattleya* seeds submitted to different tetrazolium concentration were done, in distinct periods of exposure. In the second part, ten batches of seed were stored at low temperatures, and their viability were evaluated by germination and tetrazolium tests.

keywords: Germination test. Tetrazolium test. Seed conservation. Image analysis

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	11
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	13
2 ARTIGO I: TESTE DE TETRAZÓLIO PARA AVALIAÇÃO DA QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE <i>Cattleya</i> (ORCHIDACEAE).....	14
RESUMO.....	14
ABSTRACT.....	15
2.1 Introdução.....	15
2.2 Material e Método.....	17
2.3 Resultados e Discussão.....	19
2.4 Conclusões.....	28
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29
3 ARTIGO II: VIABILIDADE E ARMAZENAMENTO DE SEMENTES DE <i>Cattleya</i> (ORCHIDACEAE).....	32
RESUMO.....	32
ABSTRACT.....	33
3.1 Introdução.....	33
3.2 Material e Método.....	36
3.3 Resultados e Discussão.....	40
3.4 Conclusões.....	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

As orquídeas (Família Orchidaceae) representam o maior grupo de plantas entre as Angiospermas, com cerca de 850 gêneros e mais de 20.000 espécies; excluindo o número de híbridos artificiais, no Brasil ocorrem 200 gêneros e 2.500 espécies. São utilizadas principalmente para ornamentação e por esse motivo vêm sendo intensamente exploradas, o que, juntamente com a intensa degradação de seus habitats, têm resultado na extinção localizada de populações nativas.

O comércio de orquídeas, como planta de vaso ou flor de corte, é bastante significativo, tendo sido a segunda planta ornamental de vaso mais vendida nos Estados Unidos no ano de 2002. A venda de 12,7 milhões de plantas (US\$ 106.000.000,00) ficou atrás apenas do bico-de-papagaio (*Poinsettia*) (US\$ 247.000.000,00) e acima dos *Crisanthemums* (US\$ 77.000.000,00) (American Orchid Society, 2003).

O cultivo de orquídeas como plantas ornamentais se iniciou na Europa por volta do século XIX, sendo as plantas oriundas majoritariamente de coletas nas Américas e Ásia Tropical. Os espécimes sobreviventes eram multiplicados por divisões ou por sementes, e geravam poucos descendentes (KNUDSON, 1922). Em 1943, as soluções nutritivas para a cultura de plantas foram estabelecidas (KNUDSON, 1943), porém apenas em 1946 foi descrito um meio eficiente para a germinação *in vitro* de *Cattleya* e alguns gêneros aparentados. Após esse evento, a propagação em larga escala, via sementes, levou a um grande aumento na multiplicação destas plantas e conseqüentemente no melhoramento das mesmas, seja por hibridação ou por seleção dentro das espécies.

As orquídeas apresentam sementes muito numerosas, com tamanho e peso reduzidos, o que torna o estabelecimento de um banco genético através do armazenamento de sementes bastante indicado, tanto para espécies silvestres, quanto para espécies já melhoradas. Para tanto a avaliação da qualidade fisiológica das sementes é importante para auxiliar em uma rápida tomada de decisão quanto ao uso ou descarte de lotes destinados ao armazenamento. Embora o teste padrão de germinação seja o parâmetro oficial mais utilizado para avaliar a qualidade fisiológica de lotes de sementes (VIEIRA; CARVALHO, 1994), em orquídeas, o

diminuto tamanho e a germinação lenta e espaçada dificultam a execução de testes para a determinação do vigor e da germinação das sementes.

Dentre os testes considerados rápidos para avaliação da qualidade das sementes, destaca-se o teste de tetrazólio, que possibilita a avaliação da viabilidade e do vigor, além de fornecer informações valiosas sobre o potencial fisiológico das sementes, para fins de semeadura. O teste permite a identificação dos fatores que influenciam a 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.

O presente trabalho foi dividido em duas partes; no primeiro capítulo foi avaliada a eficiência dos métodos de pré-condicionamento em água e em solução de sacarose, tendo como variáveis adicionais o tempo de exposição das sementes ao tetrazólio e as concentrações da solução de tetrazólio utilizada na avaliação da qualidade de lotes de sementes de orquídeas tropicais. Os resultados foram comparados aos do teste de germinação assimbiótica.

Já no segundo capítulo foram avaliados o comportamento de nove espécies de orquídeas armazenadas a baixa temperatura por um período de três meses. A qualidade fisiológica das sementes armazenadas também foi avaliada pelos dois testes, germinação e tetrazólio. Neste último foi utilizado somente o pré-condicionamento em solução de sacarose, pois foi o que apresentou melhores resultados durante as avaliações realizadas na primeira parte do trabalho.

A análise da viabilidade das sementes submetidas aos testes de tetrazólio e germinação foi realizada através da digitalização de imagens, que mostrou-se eficiente pela praticidade e controle das contagens.

A análise da eficiência de procedimentos mais simples para avaliar a qualidade fisiológica das sementes realizada neste trabalho pode permitir que eles sejam utilizados na análise de sementes de orquídeas armazenadas por pequenos produtores, o que constituiria uma ferramenta adicional para a preservação da biodiversidade.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN ORCHID SOCIETY. Business is Booming, **Orchids**, v. 72, p. 567, 2003.

KNUDSON, L. Non-symbiotic germination of orchid seeds. **Botanical Gazette**, v. 73, p. 1-25, 1922.

KNUDSON, L. Nutrient solutions for orchid seed germination. **American Orchid Society Bulletin**, v. 12, p. 77-79, 1943.

KRZYZANOWISKI, F.C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J. B. **Vigor de Sementes: Conceitos e Testes**. Associação Brasileira de tecnologia de sementes. Londrina: ABRATES, 1999. 218 p.

VIEIRA, R. D.; CARVALHO, N. M. **Testes de vigor de sementes**. Jaboticabal: FUNEP, 1994. 164 p.

## 2 ARTIGO I: TESTE DE TETRAZÓLIO PARA AVALIAÇÃO DA QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE *Cattleya* (ORCHIDACEAE)

### RESUMO

As orquídeas apresentam sementes reduzidas, cuja germinação é demorada e, muitas vezes, depende do estabelecimento de uma relação simbiótica com fungos micorrízicos. O teste de tetrazólio é um dos métodos mais promissores para estimar, de forma rápida, a viabilidade e o vigor das sementes. Sua utilização em sementes de orquídeas torna-se importante para avaliação de lotes de sementes destinados para conservação e/ou propagação. O presente trabalho teve por objetivo analisar a aplicabilidade do teste de tetrazólio para orquídeas, verificando a eficiência de métodos de pré-condicionamento, tempo de exposição das sementes ao tetrazólio e concentrações da solução de tetrazólio na avaliação da qualidade de lotes de sementes de *Cattleya*. As sementes foram submetidas aos métodos de pré-condicionamento em solução de sacarose a 10% em temperatura ambiente, por 24 horas. Após o pré-condicionamento, as sementes foram imersas em soluções de tetrazólio a 0,1; 0,25; 0,5 e 1,0% por períodos que variaram entre 3, 6, 12 e 24 horas, a 40° C, em banho-maria no escuro. Para comparação dos resultados obtidos no teste de tetrazólio, foram realizados os testes de germinação assimbiótica em meio Knudson C. As avaliações dos testes de tetrazólio e de germinação foram realizadas com o auxílio da digitalização de imagens através de scanner de mesa e câmeras digitais comerciais (5MPixel). A análise da viabilidade das sementes submetidas ao testes de tetrazólio e germinação através da digitalização de imagens mostrou-se eficiente tanto pela praticidade como pela possibilidade de controle das contagens. O pré-condicionamento em solução de sacarose 10% apresentou melhores resultados, facilitando a identificação das sementes viáveis e soluções de tetrazólio com concentrações acima de 0,25% e períodos de exposição ao tetrazólio superiores à 6 horas seriam as mais recomendadas. Os resultados das sementes pré-condicionadas ficaram mais próximos dos valores da germinação.

Palavras chave: Viabilidade. Pré-condicionamento. Análise de imagens.

## ABSTRACT

Orchids exhibited tiny seeds, with delayed germination due to the need of symbiotic relationship with some fungi. Tetrazolium test is one of the most promising methods to estimate, fastly, seed viability and vigour. Its utilization in orchid seeds became important to evaluate seed batches to propagation and conservation efforts. The aim of this work was to study the tetrazolium test for orchids, to verify the pre conditioning efficiency, time of exposure and the concentration of the tetrazolium solutions in the evaluation of tropical seed orchids. Seeds were pre conditioned in 10% sucrose solution, at room temperature, for 24h. After that they were immersed in 0.1, 0.25, 0.5 and 1% tetrazolium solutions during 3, 6, 12 and 24h at 40°C, in water bath in the dark. The results obtained in the tetrazolium test were compared with seed germination, carried out in Knudson C media. Evaluation of tetrazolium test was done by table scanner at 3600dpi with three replicates. Germination was track by digital photography (5MPixel) made with a common camera. The viability analysis using digital images was efficient due to the facilities of digitalization and to the counting control. Pre conditioning in 10% sucrose improved the seeds coloration, turning easy the seed differentiation. The results of pre conditioned seeds and assymbiotic germination was highly correlated. However, it was not possible to stablish the better concentration of tetrazolium salt.

Key words: Orchidaceae. Viability. Pre conditioning. Image analysis.

## 2.1 Introdução

O emprego de testes rápidos em programas de controle de qualidade de sementes é uma ferramenta imprescindível para a avaliação de sua qualidade fisiológica, e por isso têm merecido permanente atenção dos tecnologistas, produtores e pesquisadores. Isso reflete o refinamento da demanda de materiais que proporcionem maior segurança para fins de semeadura e/ou armazenamento, principalmente das espécies que requerem um longo período para completar o teste de germinação (MARCOS FILHO, 1994; McDONALD, 1998).

Para analisar a qualidade de um lote de sementes pode-se utilizar o teste de germinação, que consiste em determinar o potencial germinativo das sementes para fins de semeadura e produção de mudas (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000). Entretanto, tal procedimento apresenta limitações quanto à diferenciação de lotes, demora na obtenção dos resultados (CUSTÓDIO, 2005) e, particularmente para orquídeas, demanda um longo período de duração, 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 (WRIGHT; GUEST, 2005; 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, 1995; ZETTLER, 1997), bem como da capacidade de um determinado fungo isolado de induzir a germinação (HADLEY, 1982). As orquídeas apresentam sementes muito numerosas, com tamanhos e pesos peculiarmente reduzidos – variando entre 0,05 e 6,0 milímetros – havendo a possibilidade de cada fruto conter milhares de sementes (ARDITTI; GHANI, 2000). A maioria das sementes de orquídea não possui endosperma, e seus embriões constituem-se de pequenos corpos elipsoidais formados por relativamente poucas células, que acumulam reservas predominantemente lipídicas (ARDITTI, 1992).

A avaliação da qualidade fisiológica das sementes pode auxiliar na rápida tomada de decisões quanto ao uso ou descarte de lotes de sementes destinados ao armazenamento no banco de sementes. Neste sentido a utilização de um teste rápido e de baixo custo constitui uma alternativa vantajosa.

O teste bioquímico de tetrazólio, que reflete a atividade das enzimas desidrogenases envolvidas no processo de respiração celular, é um dos mais tradicionais na avaliação da qualidade e do vigor de sementes. A hidrogenação do 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio produz nas células vivas do embrião uma substância vermelha, estável e não difusível, o trifênil formazan (PIÑA-RODRIGUES et al., 2004), o que torna possível distinguir as partes vivas, coloridas de vermelho, daquelas mortas, que mantêm a sua cor original. O referido teste tem sido aceito, segundo Deswal e Chand (1997), não somente como uma técnica para estimar a viabilidade, mas também o vigor das sementes.

Na realização do teste de tetrazólio são indicados procedimentos, chamados de pré-condicionamento, que visam a penetração da solução nos tecidos

de interesse a serem avaliados. Para espécies florestais, há descrição de tratamentos de pré-condicionamento diversos, como corte, escarificação e embebição em água (DAVIDE et al., 1995; MALAVASI et al., 1996; SANTOS et al., 1998; FERREIRA et al., 2001; MENDONÇA et al., 2001; OLIVEIRA, 2004).

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, temperatura de condicionamento e avaliação adequada da coloração das sementes. O uso da digitalização das imagens das sementes pode levar à diminuição dos custos e maior agilidade dos testes, o que constitui uma alternativa tanto para laboratórios, quanto para pequenos produtores.

A metodologia para a realização do teste de tetrazólio em sementes de orquídeas tropicais ainda não foi completamente estabelecida; desta forma o presente trabalho objetivou verificar a eficiência de diferentes métodos de pré-condicionamento, concentrações e tempos de exposição à solução de tetrazólio na avaliação da qualidade de lotes de sementes de orquídeas através da utilização de técnicas de captura e ampliação de imagens digitais.

## **2.2 Material e Métodos**

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos da Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE – Presidente Prudente – SP).

Frutos com sementes de *Cattleya leopoldii* Verschaff. ex Lem e *Cattleya walkeriana* Gardn provenientes do Orquidário Aurora em Taciba- SP foram coletados nos meses de abril e julho de 2008, respectivamente. Após a coleta, os frutos foram colocados em envelope de papel e mantidos em temperatura ambiente até a deiscência. As sementes obtidas foram armazenadas sobre sílica gel a 4°C, com 6,5% de grau de umidade (BRASIL, 1992) até o início dos testes.

Os tratamentos foram arrançados no esquema fatorial 2x4x4 para cada lote de sementes, amostras com e sem pré-condicionamento em solução de sacarose a 10%, quatro períodos de exposição das sementes à solução de tetrazólio

(3, 6, 12 e 24 horas) e em quatro concentrações de sais de tetrazólio (0,1; 0,25; 0,5 e 1,0%).

As sementes foram aliqüotadas em frações de 10mg em microtubos para serem submetidas aos tratamentos específicos. O pré-condicionamento das sementes foi realizado adicionando-se 1,5mL da solução de sacarose a 10% nos microtubos por 24 horas a temperatura ambiente. Após este período, a solução de sacarose foi retirada com auxílio de uma pipeta Pasteur e as sementes foram lavadas duas vezes com a adição de 1,5mL de 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 pelo de 3, 6, 12 e 24 horas (modificado de JORDÃO et al., 1988).

A avaliação da viabilidade das sementes baseou-se na captura e ampliação de imagens digitalizadas. Após o período de incubação de cada amostra, descartou-se 1,0 ml da solução de tetrazólio e o restante foi gotejado em cima de uma placa de vidro, sendo as imagens digitalizadas capturadas em scanner de mesa HP G2710 com resolução de 3600 dpi. Para maior contraste entre as sementes coradas, foram testados fundos de colorações diferentes (preto, marrom, amarelo e branco) obtidos através de plástico aderido internamente à tampa do scanner. As contagens das sementes foram realizadas na tela do computador e as imagens foram modificadas, quando necessário, com o uso do software Adobe Photoshop® CS3, através de ferramentas de ampliação de imagem, definição de contraste e brilho. Foram consideradas viáveis as sementes portadoras de embriões coloridos de vermelho.

O teste de germinação foi realizado em meio Knudson C. (KNUDSON, 1946) adicionado de sacarose ( $20\text{g.L}^{-1}$ ) e ágar ( $6\text{g.L}^{-1}$ ). O pH foi acertado com NaOH para 5,6, o meio foi autoclavado e posteriormente distribuído em placas de Petri de 60mm. Previamente à semeadura, 10mg de cada lote de sementes foram desinfetados com DCCA – Dicloroisocianurato de sódio ( $5\text{g.L}^{-1}$ ), adicionado de algumas gotas de Tween 80. O procedimento se deu dentro de seringas, por 10 minutos, em câmara de fluxo laminar (MACHADO NETO; CUSTÓDIO, 2005), e após sua realização as sementes foram lavadas duas vezes com água destilada autoclavada. Em seguida gotejou-se 1,0 mL das soluções de sementes em placas de Petri, que foram envoltas com filme plástico e transferidas para sala de

crescimento à temperatura de  $25\pm 3^{\circ}$  C com fotoperíodo de 16 horas por aproximadamente 60 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 estereoscópio. Todos os campos das placas foram fotografados com intervalo de sete dias, orientados sempre na mesma posição. As imagens foram analisadas no computador e modificadas, quando necessário, com o uso do software Adobe Photoshop® CS3, através das ferramentas de ampliação de imagem, definição de contraste e brilho. As sementes que apresentavam 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. Os dados foram expressos em porcentagem e analisados por estatística descritiva com cálculo do desvio padrão.

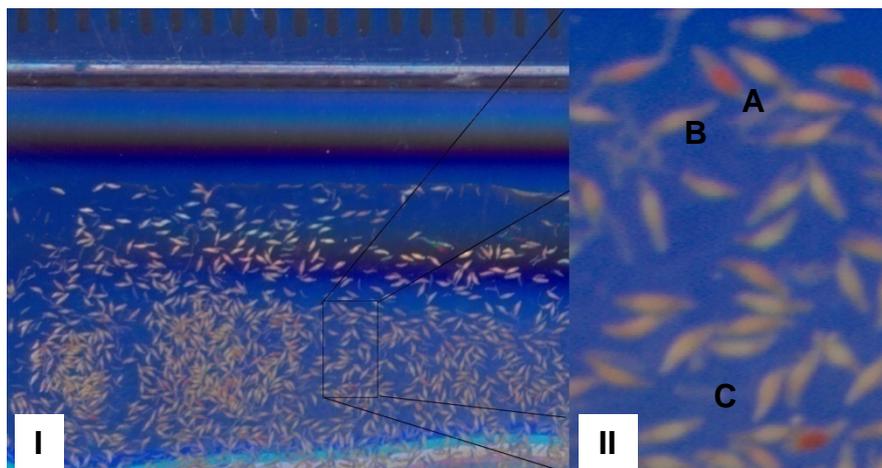
A viabilidade das sementes das orquídeas avaliadas pelos testes de tetrazólio foi expressa em porcentagem; os resultados obtidos foram, então, submetidos à análise estatística descritiva. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado e a comparação das médias foi feita pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. A análise dos dados foi realizada pelo programa SISVAR® (FERREIRA, 2000).

### **2.3 Resultados e Discussão**

As sementes de orquídeas apresentam tamanho reduzido e necessitam de equipamentos de microscopia para a sua visualização. Os instrumentos óticos utilizados para esse fim são caros e de difícil acesso para orquidários e laboratórios pequenos. Uma alternativa utilizada neste trabalho foi a digitalização de imagens das sementes utilizadas nos testes de tetrazólio e germinação, já que nos últimos anos, a popularização da tecnologia de imagem tornou scanners e câmeras digitais acessíveis a população em geral.

A análise das sementes submetidas aos testes de tetrazólio e de germinação através da digitalização de imagens mostrou-se eficiente, permitindo

diferenciar com clareza as sementes viáveis, coradas de vermelho, das sementes inviáveis, com coloração branca, sendo possível também a identificação de palhas - sementes sem embrião (Figura 1). Foram testadas diferentes colorações de fundo para a obtenção das imagens, tendo o fundo azul mostrado maior contraste em relação as sementes. A análise de imagens digitalizadas permite o uso do teste de tetrazólio por pequenos produtores, pois além de dispensar equipamentos de laboratório de alto custo como o microscópio estereoscópio, permite ao analista realizar a contagem das sementes em diferentes horários e rever as contagens realizadas, já que uma vez digitalizada, a imagem permanece armazenada no computador. Além disso, a contagem pode ser feita com a ajuda de softwares que permitem marcar as sementes viáveis na imagem, como Paintbrush®, Adobe Photoshop® CS3 ou outros softwares de imagens.

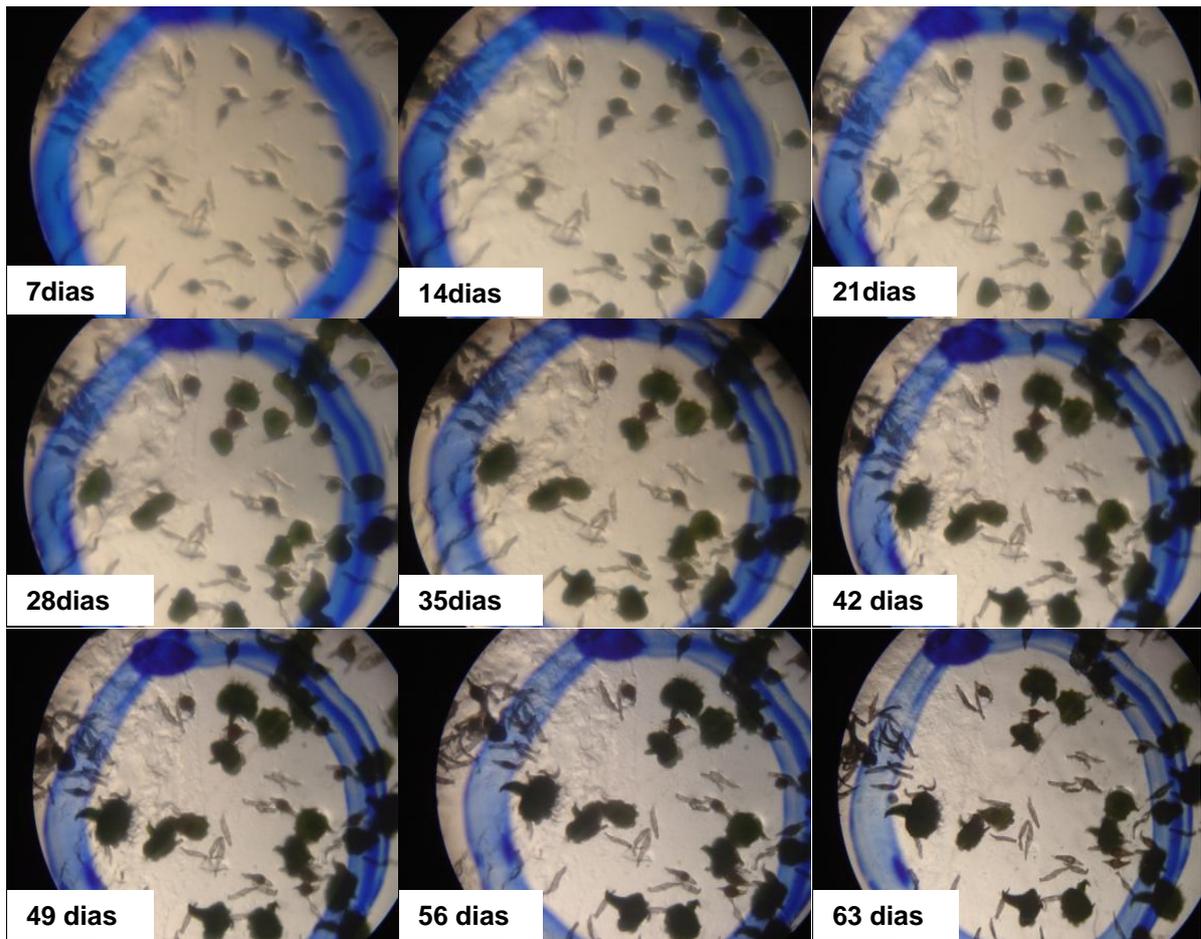


**FIGURA 1** - Imagens digitalizadas de sementes de *Cattleya walkeriana* sem pré-condicionamento e submetidas ao teste do tetrazólio. Os traços da imagem I representam a régua digitalizada e no detalhe a direita (imagem II) uma ampliação das sementes. **A**- sementes viáveis (coloração vermelha), **B**- sementes não viáveis (coloração branca) e **C**- palha (sementes sem embrião)

A análise de imagens digitais também foi utilizada no teste de germinação, através do uso de câmeras digitais comuns. Sua utilização no laboratório é possível, desde que se mantenha permanente a posição dos campos

de contagem e o cuidado no momento de acoplar a lente ocular do microscópio estereoscópio à lente da máquina fotográfica, de modo a evitar a diminuição do campo visual do microscópio estereoscópio. A utilização da digitalização de imagens no teste de germinação (Figura 2) mostrou-se importante também, pois permitiu: a revisão de contagens de todos os períodos de avaliação, as leituras das placas em períodos diferentes e a avaliação da qualidade dos protocórmios após o aumento das imagens no computador. Segundo Arditti (1992) protocórmios são estruturas embrionárias tuberiformes, geralmente clorofiladas, formadas a partir da proliferação celular do embrião que promove o rompimento do tegumento seminal. Sob condições naturais, o protocórmio permanece como tal até que seja infectado por um fungo micorrízico apropriado, para provimento inicial de nutrientes por meio da degradação de reservas acumuladas ou síntese de novas substâncias; somente após esse evento tem início a formação da gema vegetativa e seus primórdios foliares.

A utilização de softwares populares possibilitou a realização de pequenos tratamentos nas imagens, como ampliações e definição de maior contraste e brilho, o que facilitou a distinção entre sementes germinadas e não germinadas. Além disso, permitiu a marcação das sementes germinadas e a comparação de seu desenvolvimento em diferentes períodos de contagem.



**FIGURA 2** - Fotografias digitais das avaliações semanais da germinação assimbiótica de *Cattleya leopoldii* sementeas em meio Knudson C.

Os testes de germinação foram conduzidos até o 63º dia após a sementeas, pois os valores de germinação não aumentaram a partir do 35º dia e após o 49º dia foi possível observar a degradação do protocórmio (Figura 2). Na Tabela 1 encontram-se a viabilidade de orquídeas avaliadas pelo teste de germinação assimbiótica realizada em meio Knudson C.

**TABELA 1** - Valores em porcentagem de sementes de orquídeas germinadas em condições assimbióticas em meio Knudson C

Amostras	Germinação (%)						
	Períodos de avaliação						
	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias	35 dias	42 dias	49 dias
<i>Cattleya leopoldii</i>	81±5,7 <sup>1</sup>	97±0,9	99±0,3	100±0,5	100±0,5	100±0,5	100±0,5
<i>Cattleya walkeriana</i>	54±9,5	79±5,6	85±8,1	91±5,9	94±2,7	94±2,7	94±2,7

<sup>1</sup>Médias ± desvio padrão

Quanto à necessidade de pré-condicionamento, a viabilidade das sementes das duas espécies de orquídeas pré-condicionadas expostas a solução de tetrazólio por períodos de 3 e 6 horas apresentou diferenças significativas quando comparada com sementes não condicionadas e mantidas pelo mesmo período na solução de tetrazólio. No entanto, nos períodos de 12 e 24 horas de exposição à solução de tetrazólio, os valores da viabilidade para *C. leopoldii* não apresentaram diferenças significativas para sementes pré-condicionadas e não-condicionadas. Em *C. walkeriana* os resultados referentes ao período de 12 horas de exposição à solução de tetrazólio mantiveram-se semelhantes para sementes pré-condicionadas e não-condicionadas. Já no período de 24 horas as sementes pré-condicionadas apresentaram valores de viabilidade maiores (Tabela 2). Sendo assim, de maneira geral, para a maioria dos tempos de exposição à solução de tetrazólio, o pré-condicionamento mostrou-se vantajoso, permitindo a maior detecção de sementes viáveis nos menores tempos de exposição para as duas espécies de orquídeas.

**TABELA 2** - Viabilidade de sementes de orquídeas em porcentagem, avaliadas pelo teste de tetrazólio sem e com pré-condicionamento em solução de sacarose 10% por 24 horas, em diferentes intervalos de tempo

Tempo	<i>C. leopoldii</i>		<i>C. walkeriana</i>	
	Sem sacarose	Com sacarose	Sem sacarose	Com sacarose
3 horas	81 <sup>b</sup>	96 <sup>a</sup>	85 <sup>b</sup>	98 <sup>a</sup>
6 horas	68 <sup>b</sup>	90 <sup>a</sup>	84 <sup>b</sup>	97 <sup>a</sup>
12 horas	91 <sup>a</sup>	94 <sup>a</sup>	92 <sup>a</sup>	98 <sup>a</sup>
24 horas	93 <sup>a</sup>	97 <sup>a</sup>	85 <sup>b</sup>	99 <sup>a</sup>

\* Médias seguidas pela mesma letra, na horizontal, dentro de cada espécie, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Em relação à concentração da solução de tetrazólio, as sementes de *C. leopoldii* pré-condicionadas em solução de sacarose apresentaram uma viabilidade significativamente maior que as sementes não-condicionadas para todas as concentrações de sais de tetrazólio. Em *C. walkeriana* as sementes pré-condicionadas apresentaram viabilidades maiores apenas nas soluções de 0,1% e 1,0% quando comparadas com sementes não-condicionadas (Tabela 3).

**TABELA 3** - Viabilidade de sementes de orquídeas em porcentagem, avaliadas pelo teste de tetrazólio sem e com pré-condicionamento em solução de sacarose 10%, por 24 horas, submetidas a diferentes concentrações da solução de tetrazólio

Concentração de tetrazólio	<i>C. leopoldii</i>		<i>C. walkeriana</i>	
	Sem sacarose	Com sacarose	Sem sacarose	Com sacarose
0,10%	78 <sup>b</sup>	87 <sup>a</sup>	84 <sup>b</sup>	97 <sup>a</sup>
0,25%	89 <sup>b</sup>	97 <sup>a</sup>	96 <sup>a</sup>	98 <sup>a</sup>
0,50%	84 <sup>b</sup>	97 <sup>a</sup>	84 <sup>a</sup>	99 <sup>a</sup>
1,00%	81 <sup>b</sup>	97 <sup>a</sup>	82 <sup>b</sup>	98 <sup>a</sup>

\* Médias seguidas pela mesma letra, na horizontal dentro de cada espécie, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Na Tabela 4, os dados da viabilidade das sementes de *C. leopoldii* pré-condicionadas apresentaram diferenças significativas quando comparadas a sementes não-condicionadas, no período de 3 horas de exposição aos sais de tetrazólio e em três concentrações: (0,1%, 0,5% e 1,0%). No período de 6 horas as diferenças ocorreram nas concentrações de 0,25%, 0,5% e 1,0%. Nos demais períodos de exposição e concentração de sais de tetrazólio não houve diferenças significativas entre os tratamentos de sementes pré-condicionadas e não condicionadas.

**TABELA 4** - Viabilidade de sementes de *C. leopoldii*, avaliadas pelo teste de tetrazólio sem e com pré-condicionamento em solução de sacarose 10%, por 24 horas, em diferentes intervalos de concentração da solução de tetrazólio e tempo de exposição

Concentração de tetrazólio	Tempo							
	3 horas		6 horas		12 horas		24 horas	
	sem	com	sem	com	sem	com	sem	com
0,10%	61 <sup>b*</sup>	89 <sup>a</sup>	72 <sup>a</sup>	73 <sup>a</sup>	86 <sup>a</sup>	86 <sup>a</sup>	94 <sup>a</sup>	99 <sup>a</sup>
0,25%	97 <sup>a</sup>	99 <sup>a</sup>	73 <sup>b</sup>	94 <sup>a</sup>	91 <sup>a</sup>	97 <sup>a</sup>	97 <sup>a</sup>	98 <sup>a</sup>
0,50%	88 <sup>b</sup>	99 <sup>a</sup>	71 <sup>b</sup>	96 <sup>a</sup>	89 <sup>a</sup>	97 <sup>a</sup>	97 <sup>a</sup>	98 <sup>a</sup>
1,00%	80 <sup>b</sup>	98 <sup>a</sup>	57 <sup>b</sup>	98 <sup>a</sup>	97 <sup>a</sup>	97 <sup>a</sup>	92 <sup>a</sup>	95 <sup>a</sup>

\* Médias seguidas pela mesma letra, na horizontal, dentro de cada período de exposição, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Em *C. walkeriana* (Tabela 5) a viabilidade das sementes pré-condicionadas apresentou diferenças significativas quando comparada à das sementes não-condicionadas, nos períodos de 3 horas de exposição aos sais de tetrazólio nas concentrações de 0,1% e 0,5%. No período de 6 horas as diferenças ocorreram nas concentrações de 0,1% e 1,0%. No período de 12 horas a diferença ocorreu na concentração de 1,0% e no período de 24 horas as diferenças ocorreram nas concentrações de 0,5% e 1,0%.

**TABELA 5** - Viabilidade de sementes de *C. walkeriana*, avaliadas pelo teste de tetrazólio sem e com pré-condicionamento em solução de sacarose 10%, por 24 horas, em diferentes intervalos de concentração da solução de tetrazólio e tempo de exposição

Concentração de tetrazólio	Tempo							
	3 horas		6 horas		12 horas		24 horas	
	Sem	com	sem	com	sem	com	sem	com
0,10%	62 <sup>b*</sup>	98 <sup>a</sup>	80 <sup>b</sup>	95 <sup>a</sup>	98 <sup>a</sup>	98 <sup>a</sup>	97 <sup>a</sup>	97 <sup>a</sup>
0,25%	98 <sup>a</sup>	98 <sup>a</sup>	95 <sup>a</sup>	98 <sup>a</sup>	94 <sup>a</sup>	98 <sup>a</sup>	97 <sup>a</sup>	99 <sup>a</sup>
0,50%	82 <sup>b</sup>	99 <sup>a</sup>	87 <sup>a</sup>	97 <sup>a</sup>	99 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	69 <sup>b</sup>	100 <sup>a</sup>
1,00%	98 <sup>a</sup>	99 <sup>a</sup>	74 <sup>b</sup>	97 <sup>a</sup>	77 <sup>b</sup>	97 <sup>a</sup>	76 <sup>b</sup>	99 <sup>a</sup>

\* Médias seguidas pela mesma letra, na horizontal entre os tratamentos e dentro de cada período de exposição, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

O pré-condicionamento das sementes de orquídeas em solução de sacarose a 10% foi importante para homogeneizar os resultados da avaliação de viabilidade pelo teste de tetrazólio (Tabelas 2, 3, 4 e 5). Para as sementes pré-condicionadas foi possível detectar diferenças significativas para a concentração de

0,1% da solução de tetrazólio para os períodos de 3, 6 e 12 horas para *C. leopoldii*. E em *C. walkeriana* a diferença ocorreu para o tratamento de 0,1% da solução de tetrazólio, no período de 24 horas (Tabela 6).

Analisando-se a viabilidade dentro de cada período de exposição à solução de tetrazólio, mas em diferentes concentrações, houve diferenças para as concentrações de 0,1% no período de 6 horas, para *C. leopoldii*, e em *C. walkeriana* as diferenças ocorreram somente nas concentrações 0,1% e 0,5% dentro do período de 6 horas de exposição (Tabela 6). O período de tempo necessário para o desenvolvimento de coloração das sementes varia bastante entre as espécies. Delouche et al. (1976) afirmaram que sementes de uma mesma espécie ou até de um mesmo lote podem apresentar velocidade de coloração diferente. Geralmente, sementes velhas e deterioradas colorem mais rapidamente e desenvolvem coloração vermelho carmim. Um período muito longo de contato das sementes com a solução poderia acarretar no desenvolvimento de coloração muito intensa, prejudicando a interpretação do teste. Neste trabalho as sementes expostas a solução com maior concentração de tetrazólio permitiram uma melhor identificação das sementes viáveis (Figura 3), pois em baixas concentrações as sementes ficaram apenas levemente coradas, o que aumenta a chance de erro na avaliação da viabilidade das sementes. Sendo assim, a solução de tetrazólio a 1% pode ser recomendável tendo em vista a rapidez de seus resultados, entretanto a utilização de concentrações a partir de 0,25% são mais vantajosas sob o aspecto econômico.

Já em relação ao melhor período de exposição (Tabela 6), a indicação de um período de 6 horas ou 24 horas seria mais adequada para um laboratório com rotina. No período de 6 horas haveria a possibilidade dos resultados saírem no dia: sendo as sementes colocadas na solução de tetrazólio de manhã, o resultado sairia no final da tarde. Para um período de 24 horas o resultado sairia no dia seguinte. O período de 3 horas avaliado para *C. leopoldii* e *C. walkeriana* resultou em dificuldade na identificação das sementes, que adquiriram coloração fraca devido ao baixo tempo de exposição à solução de tetrazólio. O período 12 horas traria dificuldade pois os resultados sairiam fora do horário de rotina.

**TABELA 6** - Viabilidade de sementes de orquídeas, avaliadas pelo teste de tetrazólio com pré-condicionamento em solução de sacarose 10%, por 24 horas, em diferentes períodos de exposição aos sais de tetrazólio dentro de quatro concentrações da solução de tetrazólio

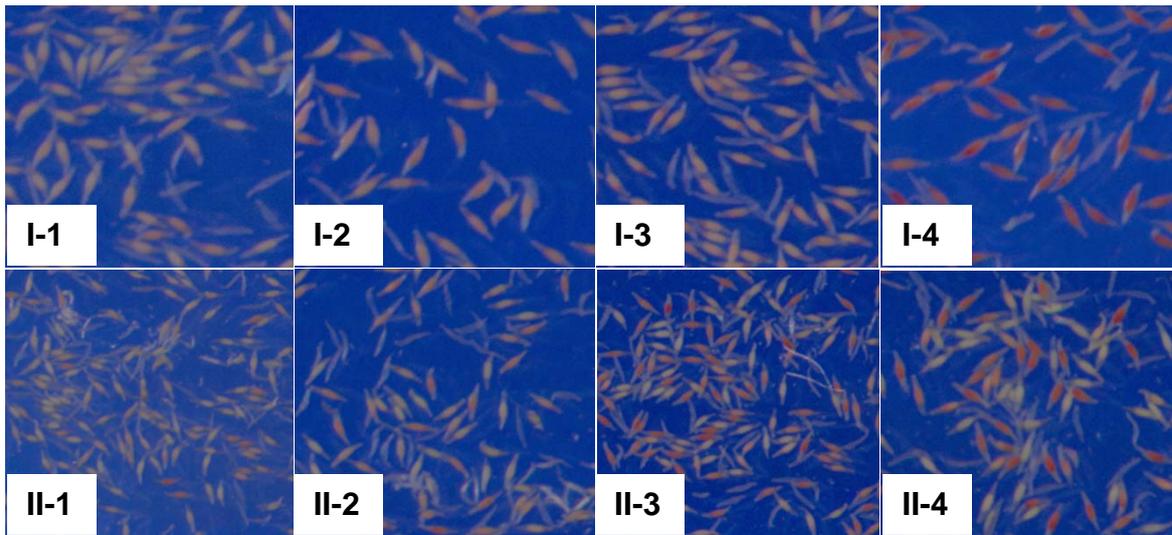
Tempo	<i>C. leopoldii</i>				<i>C. walkeriana</i>			
	Concentração de tetrazólio				Concentração de tetrazólio			
	0,10%	0,25%	0,50%	1,00%	0,10%	0,25%	0,50%	1,00%
3	89 <sup>A b</sup>	99 <sup>A a</sup>	99 <sup>A a</sup>	98 <sup>A a</sup>	98 <sup>A a</sup>	98 <sup>A a</sup>	99 <sup>A a</sup>	99 <sup>A a</sup>
6	73 <sup>A b</sup>	94 <sup>A a</sup>	96 <sup>A a</sup>	98 <sup>A a</sup>	95 <sup>B a</sup>	98 <sup>A a</sup>	97 <sup>B b</sup>	97 <sup>A a</sup>
12	86 <sup>A b</sup>	97 <sup>A a</sup>	97 <sup>A a</sup>	97 <sup>A a</sup>	98 <sup>A a</sup>	98 <sup>A a</sup>	100 <sup>A a</sup>	97 <sup>A a</sup>
24	99 <sup>A a</sup>	98 <sup>A a</sup>	98 <sup>A a</sup>	95 <sup>A a</sup>	97 <sup>A b</sup>	99 <sup>A a</sup>	100 <sup>A a</sup>	99 <sup>A a</sup>

\* Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na vertical e minúscula na horizontal dentro de cada espécie, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Na figura 3 as sementes pré-condicionadas apresentam-se coradas de forma homogênea, enquanto nas amostras sem pré-condicionamento foi mais difícil a determinação das sementes coradas das não coradas. Para Gratapaglia e Machado (1998) o tipo e a concentração dos açúcares são importantes para promover a germinação e o crescimento de plântulas *in vitro*, assim como para a própria manutenção de crescimento da raiz. Isso indica que a presença da solução de sacarose foi importante para ativar o metabolismo dos embriões permitindo uma melhor coloração das sementes viáveis.

O uso da sacarose torna-se importante também pela dificuldade de manipulação das sementes de orquídea, dado seu tamanho, que inviabiliza a utilização de rolos de papel, como acontece para sementes de grandes culturas como soja e feijão (BRASIL, 1992; KRZYZANOWSKI, et al., 1999). Isto ocorre porque a solução de sacarose mantém um maior equilíbrio osmótico entre a semente e o meio externo, impedindo que a embebição em água direta cause injúrias ao seu tegumento.

Outro aspecto importante em relação ao uso da sacarose está relacionado ao fato da solução servir como um colchão para separar as sementes de maior densidade, as quais “conteriam” embriões com maior viabilidade (JORDÃO, et al., 1998; PICOLO, et al., 2007), excluindo desta forma as sementes inviáveis. Quando submete-se as sementes diretamente na solução de tetrazólio, boa parte delas flutuam ou aderem às paredes dos microtubos, diminuindo a área de contato com a solução de tetrazólio pois, dependendo da espécie, as sementes de orquídea apresentam um espaço de ar (ARDITTI, 1992).



**FIGURA 3** - Imagens digitalizadas em scanner de mesa de sementes de *Cattleya leopoldii* submetidas ao teste de tetrazólio expostas por um período de 6 horas à solução. I- Sementes pré-condicionadas em solução de sacarose a 10% e II- sementes sem pré-condicionamento. Concentrações de 1- 0,1%; 2- 0,25%; 3- 0,5% e 4- 1% do sal de tetrazólio

## 2.4 Conclusões

A análise da viabilidade das sementes submetidas ao teste de tetrazólio e germinação através da digitalização de imagens mostrou-se eficiente tanto pela praticidade como pela possibilidade de controle das contagens.

O pré-condicionamento em solução de sacarose 10% melhorou a coloração das sementes, facilitando a identificação das sementes viáveis. Os resultados das sementes pré-condicionadas ficaram mais próximos dos valores da germinação assimbiótica.

É possível sugerir o uso de soluções de tetrazólio acima de 0,25% de concentração quando o objetivo for economia e um período de exposição das sementes ao sal, acima de 6 horas, quando o objetivo for rapidez.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ARDITTI, J. **Fundamentals of orchid biology**. New York: John Wiley & Sons, 1992. 691 p.

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

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análises de sementes**. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 1992. 365 p.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 3.ed. Campinas: Fundação Cargill, 2000. 588 p.

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

DAVIDE, A. C. et al. Avaliação da viabilidade de sementes de pau-pereira (*Platycyamus regnellii*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SEMENTES, 5., 1995, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: ABRATES, 1995. p. 178.

DELOUCHE, J. C. et al. **O teste de tetrazólio para viabilidade da semente**. Brasília: AGIPLAN, 1976. 103 p.

DESWAL, D. P.; CHAND, U. Standardization of the tetrazolium test for viability estimation in ricebean (*Vigna umbellata* (Thunb.) Ohwi & Ohashi) seeds. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 25, p. 409-417, 1997.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 255-258.

- FERREIRA, R. A. et al. Morfologia de sementes e plântulas e avaliação da viabilidade da semente de sucupira-branca (*Pterodon pubescens* Benth. Fabaceae) pelo teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 23, n. 1, p. 108-115, 2001.
- GRATAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C. ;CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI / Embrapa-CNPq, 1998. v. 2, p. 183-260.
- HADLEY, G. Orchid mycorrhiza. In: ARDITTI, J. (ed.). **Orchid biology reviews and perspectives II**. Ithaca: Cornell University Press, 1982. p. 83-118.
- JORDÃO, L. R.; LOPES, V. B.; TAKAKI, M. Selection of viable seeds in *Homidium coriaceum* Ldl. (Orchidaceae) by density separation. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 16, p. 515-519, 1988.
- KNUDSON, L. A new nutrient solution for the germination of orchid seed. **American Orchid Society Bulletin**, West Palm Beach, v. 15, p. 214-217, 1946.
- KRZYŻANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D. ;FRANÇA NETO, J. B. **Vigor de Sementes: Conceitos e Testes**. Londrina: ABRATES, 1999. 218 p.
- MACHADO NETO, N. B.; CUSTÓDIO, C. C. A medium for non-commercial sowing of orchid seed. **Selbyana**, Sarasota, v. 26, n. 1,2. p. 316-317. 2005.
- McDONALD. Seed quality assessment. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 8, p. 265-275, 1998.
- MALAVASI, M. M. et al. Avaliação da viabilidade de sementes de *Dipteryx alata* Voq. - Fabaceae (baru) através do teste de tetrazólio. In: SEMINÁRIO PANAMERICANO DE SEMILLAS, 15., WORKSHOP SOBRE MARKETING EM SEMENTES E MUDAS, 3., 1996, Gramado. **Anais...** Gramado: CESM/FELAS, 1996. p. 43.
- MARCOS FILHO, J. Utilização de testes de vigor em programas de controle de qualidade de sementes. **Informativo ABRATES**, Londrina, v. 4, n. 2, p. 33-35, 1994.
- MENDONÇA, E. A. F.; RAMOS, N. P.; PAULA, R. C. Viabilidade de sementes de *Cordia trichotoma* (Vellozo) Arrabida ex Steudel (louro-pardo) pelo teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 23, n. 2, p. 64-71, 2001.

OLIVEIRA, L. M. **Avaliação da qualidade de sementes de *Tabebuia serratifolia* Vahl Nich. e *T. impetiginosa* (Martius Ex A. P. de Candolle Standley) envelhecidas natural e artificialmente.** 2004. 160 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.

PICCOLO, M. R. et al. Separação de sementes viáveis de orquídeas através de gradientes de concentração de sacarose. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 58., 2007, São Paulo. **Anais...** São Paulo, 2007.

PIÑA-RODRIGUES, F. C.; FIGLIOLIA, M. B.; PEIXOTO, M. C. Teste de qualidade. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. (Org.). **Germinação – do básico ao aplicado.** Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 283- 297.

RASMUSSEN, H. N. **Terrestrial orchids from seed to mycotrophic plants.** Cambridge: Cambridge University Press, 1995. 456 p.

SANTOS, M. F. et al. Avaliação da qualidade sanitária e fisiológica das sementes de caroba (*Cybistax antisiphilitica* (Mart.) Mart.). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 20, n. 1, p. 1-6, 1998.

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

ZETTLER, L. W. Symbiotic seed germination of terrestrial orchids in North America during the last decade: a progress report. In: ALLEN, C. (ed.). **Proceedings of the North American terrestrial orchids: propagation and production conference.** Washington, DC, USA: National Arboretum, 1997. 43-54 p.

WRIGHT, M.; GUEST, D. Development of mycorrhiza association in *Caladenia tentaculata*. **Selbyana**, Sarasota, v. 26, n. 1-2, p. 114-124, 2005

### 3 ARTIGO II: VIABILIDADE E ARMAZENAMENTO DE SEMENTES DE *Cattleya* (ORCHIDACEAE)

#### RESUMO

As orquídeas (Família Orchidaceae) representam o maior grupo de plantas entre as Angiospermas, porém a extinção localizada de populações nativas tem ocorrido como resultado de sua utilização para ornamentação e da degradação de seus habitats. Sendo assim a conservação de sementes – tanto para espécies silvestres que carregam características próprias, quanto para espécies já melhoradas – faz-se necessária e torna-se bastante interessante, já que seu tamanho é bastante reduzido. A avaliação da qualidade fisiológica das sementes pode auxiliar na rápida tomada de decisão quanto ao uso ou descarte de lotes destinados a conservação. Para analisar a qualidade das sementes utilizou-se o teste de germinação em meio Knudson C e o teste de tetrazólio com pré-condicionamento em solução de sacarose 10%, em dois períodos de armazenamento, durante três meses à -18° C. Foram testados dez lotes de sementes de nove espécies (*Cattleya granulosa*, *Cattleya hegeriana*, *Cattleya intermedia*, *Cattleya leopoldii*, *Cattleya mossiae*, *Cattleya purpurata*, *Cattleya sanguiloba*, *Cattleya tenuis* e *Cattleya walkeriana*) e as leituras dos testes foram realizadas pela digitalização de imagens. Foram avaliados: a porcentagem de sementes viáveis pelo teste de tetrazólio com e sem pré-condicionamento, a porcentagem de germinação e curvas de germinação, o Índice de Velocidade de Germinação (IVG) e a correlação entre os testes de tetrazólio e germinação. Os resultados demonstraram não haver perda na viabilidade das sementes armazenadas analisadas pelos testes de tetrazólio e germinação. Em cinco lotes houve diminuição do IVG e foi alta a correlação entre os testes de tetrazólio com pré-condicionamento e a germinação. O uso da digitalização de imagens mostrou-se eficiente, permitindo a utilização da técnica por pequenos produtores, o que pode auxiliar na conservação de orquídeas.

Palavras chave: Orchidaceae. Tetrazólio. Germinação. Análise de imagens.

## ABSTRACT

Orchids are the biggest group of Angiosperms. However, there are localized extinction of some species as a result of ornamentation and habitat degradation. So, seed storage, either for bred or for non bred species, is a need and it is very interesting, because a large amount of seeds could be stored in a small flask. Evaluation of seed physiological quality can aid in the decision of use or discard of batches to conservation. To score seed quality, seeds were germinated in Kundson c medium and analyzed by the tetrazolium test with pre conditioning in 10% sucrose solution and stored at -18°C during three months. Ten seed batches were tested from nine species (*Cattleya intermedia*, *Cattleya tenuis*, *Cattleya hegeriana*, *Cattleya sanguiloba*, *Cattleya granulosa*, *Cattleya leopoldii*, *Cattleya walkeriana*, *Cattleya purpurata* e *Cattleya mossiae*). The tetrazolium test counting was made with digitalized images at 3600dpi. Seed viability (with or without pre conditioning in 10% sucrose), Germination, Germination Velocity Index (IVG) and the correlation between them were evaluated. Results showed there was no loss of viability in the stored seeds, either by tetrazolium test or by the germination. In five lots there were a decay in the IVG. The correlation between pre conditioned seeds in the Tetrazolium test and germination was high. Digitalization of images was efficient, what could allow the use of the techniques by small growers improving orchid conservation.

Key words: Orchidaceae. Tetrazolium. Germination. Image analysis.

### 3.1 Introdução

As orquídeas (Família Orchidaceae) representam o maior grupo de plantas entre as Angiospermas, com cerca de 850 gêneros e mais de 20.000 espécies; excluindo o número de híbridos artificiais, no Brasil ocorrem 200 gêneros e 2.500 espécies (SOUZA; LORENZI, 2008). São utilizadas principalmente para ornamentação e por esse motivo vêm sendo intensamente exploradas, o que, juntamente com a degradação de seus habitats, tem resultado na extinção localizada de populações nativas.

Existem vários sistemas comerciais de propagação de orquídeas, sendo os mais simples, variações de algum processo de propagação assexuada como: divisão de touceiras, divisão de pseudobulbos, divisão de bulbos velhos e indução de brotamento a partir de hastes florais. Entretanto tais processos, embora triviais e com resultados seguros, têm uma capacidade reprodutiva limitada, pois sempre dependem de algum indivíduo adulto a ser utilizado para formar uma nova planta, que demora de 2 a 8 anos para chegar à idade adulta. Já a reprodução sexuada das orquídeas não é comumente realizada por pequenos produtores, apesar de um único fruto poder conter mais de 800.000 sementes. Assim, os métodos *in vitro* para reprodução sexuada têm sido preferidos por estabelecimentos comerciais de grande porte, pois apesar do custo elevado, oferecem capacidade produtiva elevadíssima e apresentam resultados mais seguros.

As diminutas sementes de orquídea são destituídas de endosperma, sendo os embriões constituídos de pequenos corpos elipsoidais formados por relativamente poucas células, que acumulam reservas predominantemente lipídicas. As sementes de orquídeas apresentam, em geral, um padrão bastante uniforme de germinação e desenvolvimento, iniciando-se pela embebição da semente, que acarreta o rompimento do tegumento seminal e a liberação do embrião, uma estrutura tuberiforme, geralmente clorofilada, chamada de protocórmio. Sob condições naturais, o protocórmio permanece como tal até que seja infectado por um fungo micorrízico apropriado, para provimento inicial de nutrientes por meio da degradação de reservas acumuladas ou síntese de novas substâncias; somente após esse evento tem início a formação da gema caulinar e seus primórdios foliares. A formação da raiz ocorre mais tarde, após o surgimento de várias folhas (ARDITTI, 1992).

Segundo Machado Neto e Custódio (2005b), os parâmetros para a estocagem de sementes de orquídeas não foram muito estudados e existem problemas em relação a sua metodologia. Tais problemas envolvem temperatura, umidade da semente e sobrevivência do embrião em cada tipo de estocagem. 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. Uma terceira categoria, sementes intermediárias, foi definida por Ellis et al. (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 uma classificação de sementes em duas categorias: ortodoxas e intermediárias (ou recalcitrantes). As sementes ortodoxas toleram dessecação e umidade de cerca de 30% ou até menos; entretanto, há dois sub-grupos reconhecidos em relação ao comportamento de estocagem para as espécies de sementes ortodoxas: as verdadeiramente ortodoxas e as essencialmente ortodoxas. As espécies verdadeiramente ortodoxas podem ser preservadas a 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.

A conservação de sementes de orquídeas torna-se bastante interessante já que cada fruto pode conter milhares de sementes, as quais são bastante pequenas, variando de 0,05 a 6,0 milímetros cada (ARDITTI; GHANI, 2000). Entretanto, é comum a formação de cápsulas contendo sementes sem embriões e por isso é interessante que se teste a qualidade fisiológica das sementes antes de sua conservação.

Para analisar a qualidade das sementes pode-se utilizar o teste de germinação, que consiste em determinar o potencial germinativo das sementes para fins de semeadura e produção de mudas (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000); no entanto tal procedimento apresenta limitações quanto à diferenciação de lotes, demora na obtenção dos resultados (CUSTÓDIO, 2005) e, no caso das orquídeas, custo elevado, pois é necessário que suas sementes estabeleçam uma relação com fungos micorrízicos e/ou a utilização de meios de culturas para a sua germinação (ALVAREZ-PARDO et al., 2006).

Outra forma de analisar a viabilidade das sementes são os testes bioquímicos como o de tetrazólio, que é um dos mais tradicionais na avaliação da qualidade e do vigor de sementes. O teste de tetrazólio reflete a atividade das enzimas desidrogenases, envolvidas no processo de respiração celular. A hidrogenação do 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio produz nas células vivas uma substância vermelha, estável e não difusível, o trifênil formazan (PIÑA-RODRIGUES et al., 2004), o que torna possível distinguir as partes vivas, coloridas de vermelho, daquelas mortas, que mantêm a sua cor original.

Na realização do teste de tetrazólio são indicados procedimentos, chamados de pré-condicionamento, que visam à penetração da solução nos tecidos de interesse a serem avaliados. Para espécies florestais, há descrição de tratamentos de pré-condicionamento diversos, como corte, escarificação e embebição em água (DAVIDE et al., 1995; MALAVASI et al., 1996; SANTOS et al., 1998; FERREIRA et al., 2001; MENDONÇA et al., 2001; OLIVEIRA, 2004).

No caso das orquídeas se faz necessário o uso de um instrumento de ampliação para a diferenciação das sementes, devido ao seu tamanho diminuto. O uso da digitalização das imagens das sementes pode levar à diminuição dos custos e maior agilidade dos testes, o que constitui uma alternativa tanto para laboratórios, quanto para pequenos produtores.

O estabelecimento de um banco genético através do armazenamento de sementes seria de extrema importância, tanto para espécies silvestres que carregam características próprias, quanto para espécies já melhoradas (ALVAREZ-PARDO; FERREIRA, 2006). O sucesso nos resultados pode permitir a utilização de procedimentos mais simples de conservação de sementes de orquídeas por pequenos produtores.

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo comparar os testes de germinação e modificações do teste de tetrazólio com o pré-condicionamento para avaliar a qualidade fisiológica das sementes de *Cattleya* armazenadas em baixa temperatura.

### **3.2 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 coletadas de frutos de nove espécies diferentes: *Cattleya granulosa* (2 lotes), *Cattleya hegeriana*, *Cattleya intermedia*, *Cattleya leopoldii*, *Cattleya mossiae*, *Cattleya purpurata*, *Cattleya sanguiloba*, *Cattleya tenuis* e *Cattleya walkeriana*, provenientes do Orquidário Aurora (Taciba-SP). A coleta das cápsulas ocorreu em diferentes épocas (Tabela 1), quando foram

colocadas em envelope de papel, tendo sido mantidas em temperatura ambiente até a deiscência dos frutos. As sementes de cada planta foram armazenadas em envelope de papel sobre sílica gel a 4°C, com 6,5% de grau de umidade (BRASIL, 1992) até o início dos testes.

**TABELA 1** - Relação dos lotes de sementes de orquídeas avaliadas, risco de extinção, períodos de polinização e coleta dos frutos, identificação dos biomas e distribuição geográfica das espécies

Amostra	Risco	Data de polinização	Data de coleta	Bioma	Distribuição
<i>Cattleya walkeriana</i> Gardn.	2,5	21/11/2007	08-07-2008	Cerrado	SP, MG, MS, GO, MT
<i>Cattleya tenuis</i> M.A. Campacci & P.L. Vedovello	1	20/09/2006	15/03/2007	Cerrado	BA
<i>Cattleya hegeriana</i> (Campacci) Van den Berg**	-	18/11/2007	15/08/2008	Campo Rupestre	RJ
<i>Cattleya sanguiloba</i> (Withner) Van den Berg & M.W.Chase*	-	31/12/2007	03/08/2008	Campo Rupestre	MG
<i>Cattleya granulosa</i> Lindl.	1	27/11/2007	15/06/2008	Mata Atlântica	AL, BA, ES, PB, PE, RN
<i>Cattleya leopoldii</i> Verschaff. ex Lem.	-	27/11/2007	03/04/2008	Mata Atlântica	RS
<i>Cattleya intermedia</i> Graham ex Hook.	3	27/11/2007	05/02/2008	Mata Atlântica	RS, SC, SP e RJ
<i>Cattleya purpurata</i> (Lindl. & Paxton) Van den Berg & M.W.Chase*	3,4	27/11/2007	26-08-08	Mata Atlântica	RS, SC, SP
<i>Cattleya granulosa</i> Lindl.	1	11/2006	06/2007	Mata Atlântica	AL, BA, ES, PB, PE, RN
<i>Cattleya mossiae</i> Parker ex Hooker	-	06/10/2006	10/08/2007	Floresta Amazônica (Venezuela)	-

\*VAN DEN BERG, C.& CHASE,2000.; \*\*VAN DEN BERG, C., 2008.

<sup>1</sup> Lista Oficial de Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção. (BRASIL, Ministério do Meio Ambiente, 2008)

<sup>2</sup> Lista Oficial de Espécies da Flora Brasileira com Deficiências de Dados. (BRASIL, Ministério do Meio Ambiente, 2008)

<sup>3</sup> Lista da Flora Ameaçada de Extinção do Rio Grande do Sul (Secretaria do Meio Ambiente do Estado do Rio Grande do Sul, 2002)

<sup>4</sup> Lista Oficial das Espécies da Flora do Estado de São Paulo Ameaçadas de Extinção. (2004)

<sup>5</sup> Lista das Espécies Presumivelmente Ameaçadas de Extinção da Flora do Estado de Minas Gerais.(1997)

Para a avaliação da viabilidade das sementes pelo teste de tetrazólio foram aliqüotados 10 miligramas de sementes de cada lote em dois microtubos.

O primeiro tubo de cada lote de sementes (Tratamento A) recebeu 1,5mL de solução de tetrazólio (Cloreto de 2,3,5-Trifenil-Tetrazólio) a 1%, e foi submetido a 24 horas de banho-maria à temperatura de 40° C, em ambiente escuro (modificado de JORDÃO et al., 1988).

No segundo tubo (Tratamento B) foi realizado o pré-condicionamento das sementes 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 procedeu-se ao teste de tetrazólio como descrito anteriormente para o tratamento A.

A metodologia empregada na determinação da viabilidade das sementes baseou-se na utilização de imagens digitalizadas por computador em lugar do microscópio estereoscópico, que é normalmente utilizado. Após o período de incubação de cada amostra, descartou-se 1,0 mL da solução de tetrazólio 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. Para maior contraste entre as sementes coradas, foram testados fundos de colorações diferentes (preto, marrom, amarelo e branco) obtidos por um plástico aderido internamente à tampa do scanner. As contagens das sementes foram realizadas na tela do computador e as imagens foram modificadas, quando necessário, com o uso do software Adobe Photoshop® CS3, através de ferramentas de ampliação de imagem, definição de contraste e brilho. Foram consideradas viáveis as sementes portadoras de embriões coloridos de vermelho, sendo as sementes com coloração branca, consideradas inviáveis.

O teste de germinação foi realizado em meio Knudson C (KNUDSON, 1946) adicionado de sacarose ( $20\text{g.L}^{-1}$ ) e ágar ( $6\text{g.L}^{-1}$ ). O pH foi acertado com NaOH para 5,6 e o meio de cultura foi autoclavado e posteriormente distribuído em placas de Petri de 60 mm. Previamente à sementeira, 20 mg de cada lote de sementes foram desinfetadas por 10 minutos com DCCA – Dicloroisocianurato de sódio ( $5\text{g.L}^{-1}$ ), com adição de algumas gotas de Tween 80, dentro de seringas em câmara de fluxo laminar (MACHADO NETO; CUSTÓDIO, 2005a). 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. Logo após as placas foram envoltas com filme plástico e transferidas para sala de crescimento à temperatura de  $25\pm 3^{\circ}$  C com fotoperíodo de 16 horas por aproximadamente 60 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. 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® CS3, através de ferramentas de ampliação de imagem, definição de contraste e brilho. As sementes que apresentavam 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.

As sementes dos 10 lotes de orquídeas foram armazenadas a  $-18^{\circ}$  C por 90 dias em microtubos, acondicionados em frascos de vidro hermeticamente fechados contendo sílica gel.

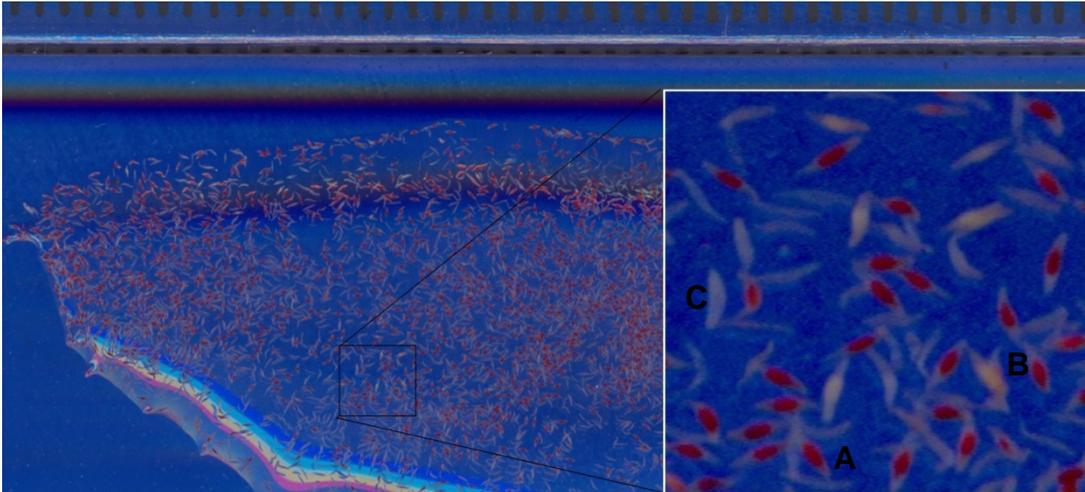
A viabilidade das sementes de orquídea, verificada pelo teste de Tetrazólio (Tratamentos A e B) e a taxa germinação foram expressas em porcentagem. O Índice de Velocidade de Germinação para cada lote de sementes foi calculado conforme Maguire (1962), tendo as avaliações ocorrido no início do armazenamento e após três meses de armazenamento. Foram calculados os coeficientes de correlação linear pelo teste *t*, ao nível de 5% de probabilidade, entre os testes de germinação e de Tetrazólio (Tratamentos A e B) e as comparações de médias foram feitas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Também foram realizados ajustes das equações de regressão, com análise de significância. A análise dos dados foi realizada pelo programa SISVAR® (FERREIRA, 2000).

### 3.3 Resultados e Discussão

Foram analisados dez lotes de sementes de nove espécies, sendo duas delas (*Cattleya tenuis* e *Cattleya granulosa*) integrantes da Lista Oficial de Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção (BRASIL, 2008). Já a espécie *Cattleya walkeriana* está incluída na Lista Oficial de Espécies da Flora Brasileira com Deficiências de Dados (BRASIL, 2008) e na Lista das Espécies Presumivelmente Ameaçadas de Extinção do Estado de Minas Gerais; *Cattleya purpurata* figura nas Listas Oficiais da Flora Ameaçada de Extinção dos Estados do Rio Grande do Sul (Secretaria do Meio Ambiente do Estado do Rio Grande do Sul, 2008) e São Paulo e *Cattleya intermedia* que aparece na Lista da Flora Ameaçada de Extinção do Rio Grande do Sul. *Cattleya mossiae* tem origem na Venezuela (Tabela 1).

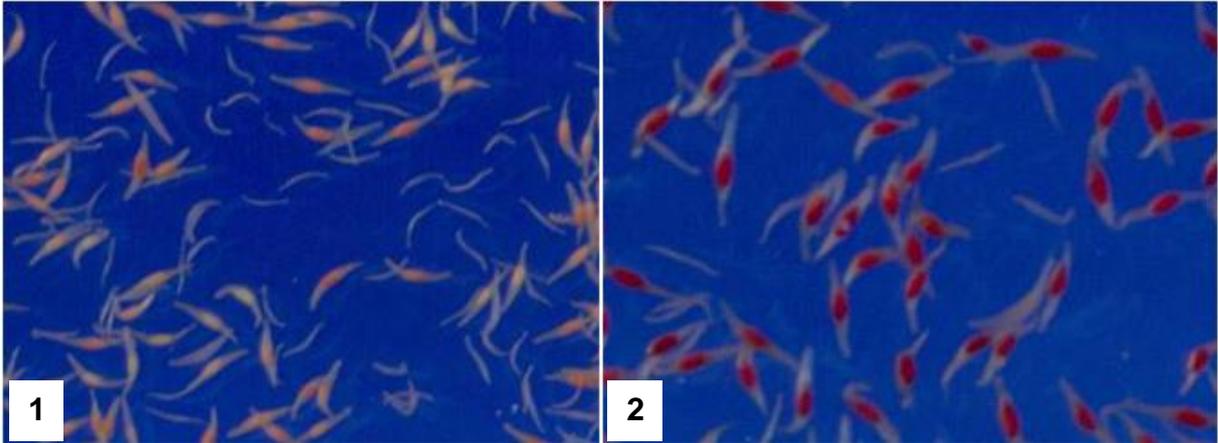
O uso de imagens digitalizadas já foi descrito para análise de plântulas de milho, soja (TEIXEIRA, 2004), eucalipto e tomate (DORNELAS et al., 2005). Essa ferramenta torna possível que pequenos produtores testem, *in loco*, a viabilidade das sementes, o que auxilia na conservação das espécies de orquídeas, dispensando a aquisição e utilização de equipamentos sofisticados de laboratório e treinamento específico para realizar o teste de germinação das sementes.

A análise das sementes submetidas ao teste de tetrazólio através da digitalização de imagens mostrou-se eficiente, permitindo diferenciar as sementes viáveis, coradas de vermelho, das sementes inviáveis, com coloração branca, além de possibilitar também a identificação de palhas, sementes sem embrião (Figura 1). Foram testadas diferentes colorações de fundo para a captura de imagens, tendo o fundo azul oferecido maior contraste com as imagens das sementes. A análise de imagens digitalizadas possibilita o uso do teste de tetrazólio por pequenos produtores, pois não há necessidade de utilização de equipamentos de laboratório de alto custo, como o microscópio estereoscópico. A técnica também permite ao analista realizar a contagem das sementes em diferentes horários, além da revisão das contagens realizadas, pois uma vez digitalizada, a imagem fica disponível no computador. A marcação das sementes viáveis na imagem pode ser feita com a utilização de softwares como o Paintbrush®, Adobe Photoshop® CS3 ou outros programas de imagens.



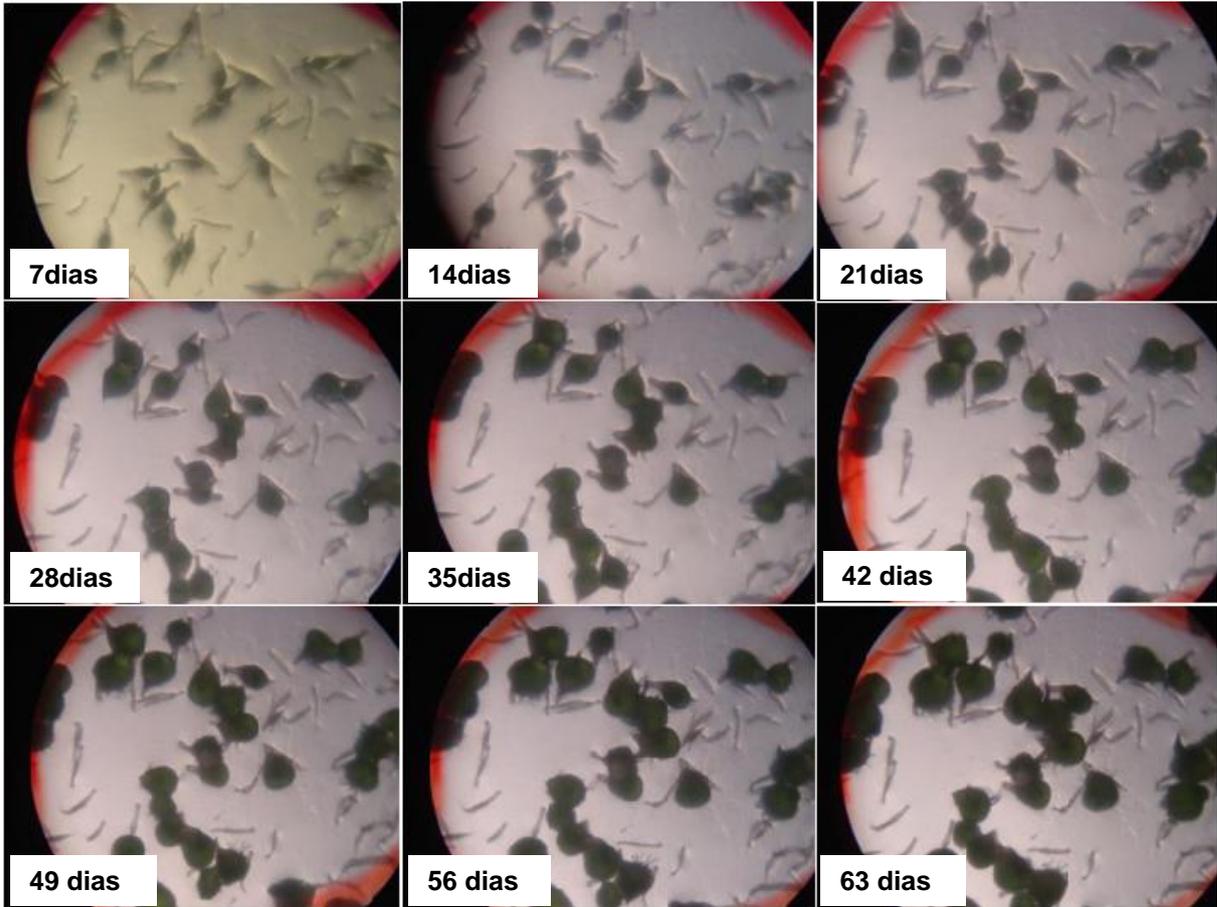
**FIGURA 1** - Sementes de *Cattleya granulosa* pré-condicionadas em solução de sacarose 10% e submetidas ao teste do tetrazólio (Tratamento B). Os traços da imagem maior estão divididos em milímetros e no detalhe a direita uma ampliação das sementes. **A**- sementes viáveis (coloração vermelha), **B**- sementes não viáveis (coloração branca) e **C**- palha (sementes sem embrião)

O pré-condicionamento em solução de sacarose 10% permitiu uma coloração mais evidente entre as sementes viáveis (Figura 2), facilitando a contagem das mesmas. O uso da solução de sacarose 10% no pré-condicionamento torna-se importante para manter um maior equilíbrio osmótico entre a semente e o meio externo, impedindo que a embebição em água direta cause injúrias ao seu tegumento. Segundo Arditti, 1992, a presença da sacarose na germinação *in vitro* acaba sendo responsável pela ativação do embrião, já que as sementes são pequenas, não apresentam reservas em abundância e na natureza dependem da associação com micorrizas para o fornecimento de nutrientes ao embrião.

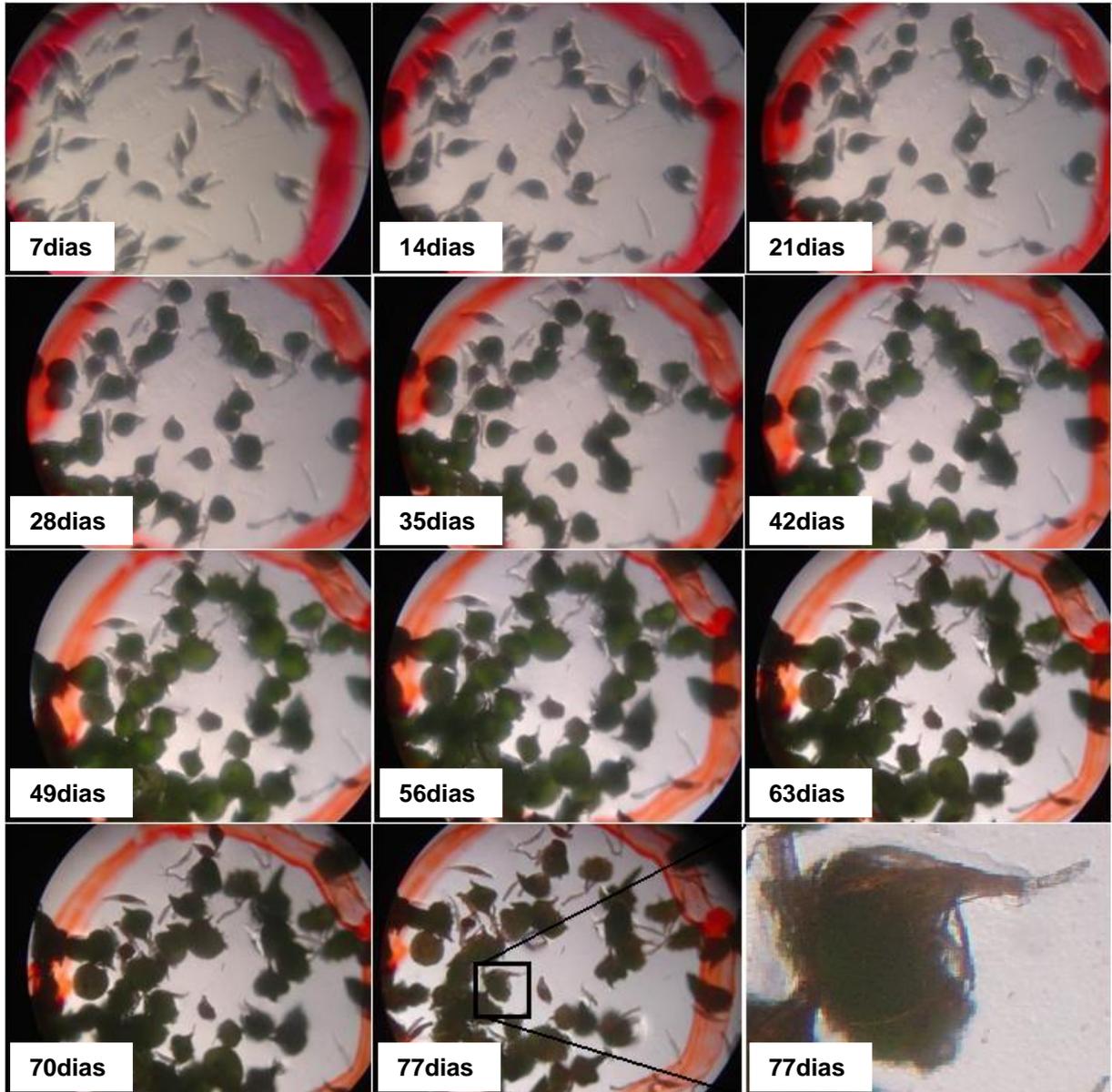


**FIGURA 2** - Imagens digitalizadas em scanner de mesa do teste de tetrazólio em sementes de *Cattleya sanguiloba* antes do armazenamento. 1- amostra sem pré-condicionamento (Tratamento A) e 2- com pré-condicionamento em solução de sacarose 10% (Tratamento B)

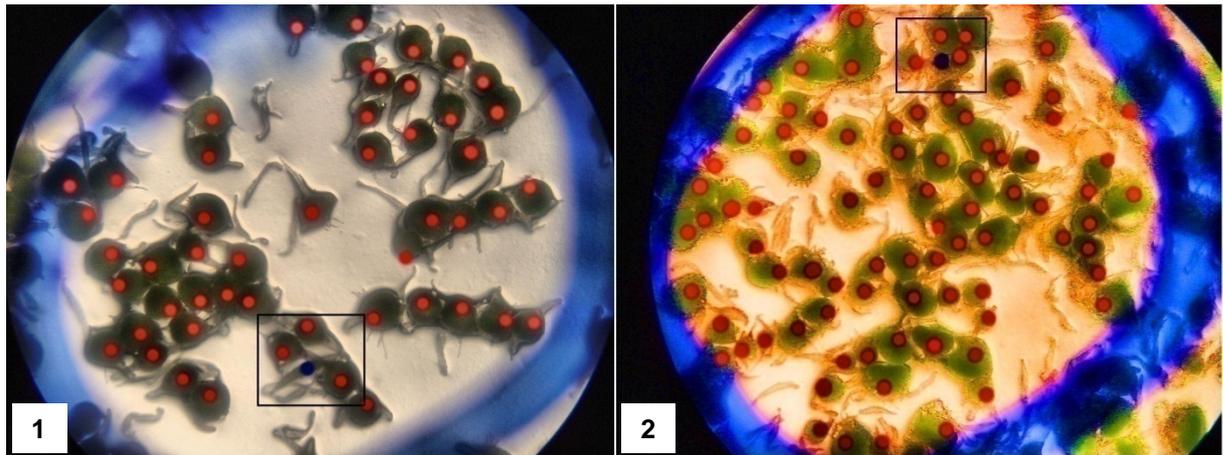
O resultado obtido no teste de germinação mostrou a possibilidade de utilização de máquinas digitais comuns no laboratório, desde que se mantenha a padronização dos campos de contagem e cuidado no procedimento ao acoplar a lente ocular do microscópio estereoscópico à lente da câmera fotográfica, de modo a evitar a diminuição no campo visual do microscópio estereoscópico. A utilização da digitalização de imagens no teste de germinação (Figuras 3 e 4 ) mostrou-se importante, pois permitiu a revisão de contagens de todos os períodos de avaliação, a leitura das placas em períodos diferentes e a avaliação da qualidade dos protocórmios pelo aumento das imagens no computador (Figura 4). Com a utilização de softwares populares foi possível realizar pequenos tratamentos, como ampliações, alterações no contraste e no brilho das imagens, os quais facilitaram a distinção entre sementes germinadas e não germinadas, além de permitir a marcação das sementes que germinaram e a comparação do seu desenvolvimento em diferentes períodos de contagem (Figura 5).



**FIGURA 3** - Fotografias digitais das avaliações semanais da germinação de sementes de *Cattleya sanguiloba* antes do armazenamento a  $-18^{\circ}\text{C}$



**FIGURA 4** - Fotografias digitais das avaliações semanais da germinação de sementes de *Cattleya purpurata* antes do armazenamento a  $-18^{\circ}$  C. No último quadro a direita, detalhe de um protocórmio debilitado no 77º dia de germinação



**FIGURA 5** - Fotografias digitais da germinação de sementes de *Cattleya intermedia* (1) e *Cattleya hegeriana* (2) antes do armazenamento, no 21º dia após a semeadura. Imagens trabalhadas no software Adobe Photoshop® CS3, pontos vermelhos utilizados para marcar sementes germinadas e pontos azuis para marcar sementes não germinadas

Os testes de germinação foram conduzidos até o 56º dia após a semeadura, pois os valores de germinação não aumentaram a partir do 49º dia e após o 63º dia foi possível observar degradação do protocórmio. Isso está evidenciado na Figura 4, onde está detalhado um protocórmio de *Cattleya purpurata* bastante debilitado, mostrando a alteração de cor de verde para marrom, desidratação e formação de camadas escuras ao seu redor. Como o experimento envolveu a utilização de muitas espécies raras na natureza, houve interesse em utilizar as plântulas em outros projetos, principalmente de reintrodução, e dessa forma fizeram-se necessários os repiques destas plântulas para um novo meio.

Na Tabela 2 é possível observar que não houve perda da viabilidade nas sementes armazenadas durante três meses a  $-18^{\circ}\text{C}$  de acordo com os valores de germinação total. Pelo contrário, em *C. tenuis*, *C. mossiae*, *C. granulosa-I* e *C. granulosa-II*, foi possível observar um aumento significativo na germinação final após o armazenamento, comparado com os dados iniciais. Este fato pode estar relacionado a uma alteração da membrana após o processo de congelamento e também a uma quebra de dormência (BEWLEY; BLACK, 1994). Em *C. intermedia*, *C. hegeriana*, *C. sanguiloba*, *C. leopoldii*, *C. walkeriana* e *C. purpurata* houve uma diminuição significativa nas germinações avaliadas ao 7º dia, porém ao 14º dia, cinco dos seis lotes já apresentavam valores semelhantes de germinação antes e

após o armazenamento. Analisando as curvas de germinação, nas Figuras 6 e 7, verifica-se que na porcentagem de germinação total não houve perda de viabilidade para os dez lotes analisados. Em *C. hegeriana*, *C. sanguiloba*, *C. leopoldii*, *C. walkeriana* e *C. purpurata* apresentaram uma germinação inicial menor após o armazenamento das sementes em  $-18^{\circ}\text{C}$ , porém no 28<sup>o</sup> dia ocorreu uma sobreposição das curvas de germinação, igualando os valores de germinação total para as sementes armazenadas e não armazenadas. Já as espécies *C. tenuis*, *C. granulosa* (lote I), *C. granulosa* (lote II) e *C. mossiae* mantiveram as suas duas curvas de germinação distintas (antes e após o armazenamento), sendo que os valores de germinação após o armazenamento foram maiores para estes quatro lotes.

**TABELA 2** - Valores em porcentagem de sementes de orquídeas germinadas *in vitro* antes e após três meses de armazenamento a  $-18^{\circ}\text{C}$  avaliadas em três períodos distintos

Amostras	Germinação					
	7 dias		14 dias		Total	
	Início	Após 3 meses	Início	Após 3 meses	Início	Após 3 meses
<i>C. intermedia</i>	84 <sup>a</sup>	43 <sup>b</sup>	93 <sup>a</sup>	94 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	99 <sup>a</sup>
<i>C. tenuis</i>	16 <sup>a</sup>	17 <sup>a</sup>	21 <sup>b</sup>	49 <sup>a</sup>	59 <sup>b</sup>	73 <sup>a</sup>
<i>C. hegeriana</i>	87 <sup>a</sup>	53 <sup>b</sup>	97 <sup>a</sup>	98 <sup>a</sup>	98 <sup>a</sup>	99 <sup>a</sup>
<i>C. sanguiloba</i>	64 <sup>a</sup>	43 <sup>b</sup>	85 <sup>a</sup>	93 <sup>a</sup>	98 <sup>a</sup>	99 <sup>a</sup>
<i>C. granulosa-I</i>	63 <sup>a</sup>	65 <sup>a</sup>	80 <sup>b</sup>	96 <sup>a</sup>	91 <sup>b</sup>	99 <sup>a</sup>
<i>C. leopoldii</i>	81 <sup>a</sup>	50 <sup>b</sup>	97 <sup>a</sup>	97 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	99 <sup>a</sup>
<i>C. walkeriana</i>	54 <sup>a</sup>	43 <sup>b</sup>	79 <sup>a</sup>	67 <sup>b</sup>	94 <sup>a</sup>	96 <sup>a</sup>
<i>C. purpurata</i>	77 <sup>a</sup>	43 <sup>b</sup>	85 <sup>a</sup>	94 <sup>a</sup>	95 <sup>a</sup>	97 <sup>a</sup>
<i>C. granulosa-II</i>	44 <sup>a</sup>	44 <sup>a</sup>	64 <sup>b</sup>	96 <sup>a</sup>	86 <sup>b</sup>	99 <sup>a</sup>
<i>C. mossiae</i>	5 <sup>b</sup>	23 <sup>a</sup>	9 <sup>b</sup>	59 <sup>a</sup>	48 <sup>b</sup>	68 <sup>a</sup>

\* Médias seguidas pela mesma letra, na horizontal dentro de cada período de avaliação da germinação, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

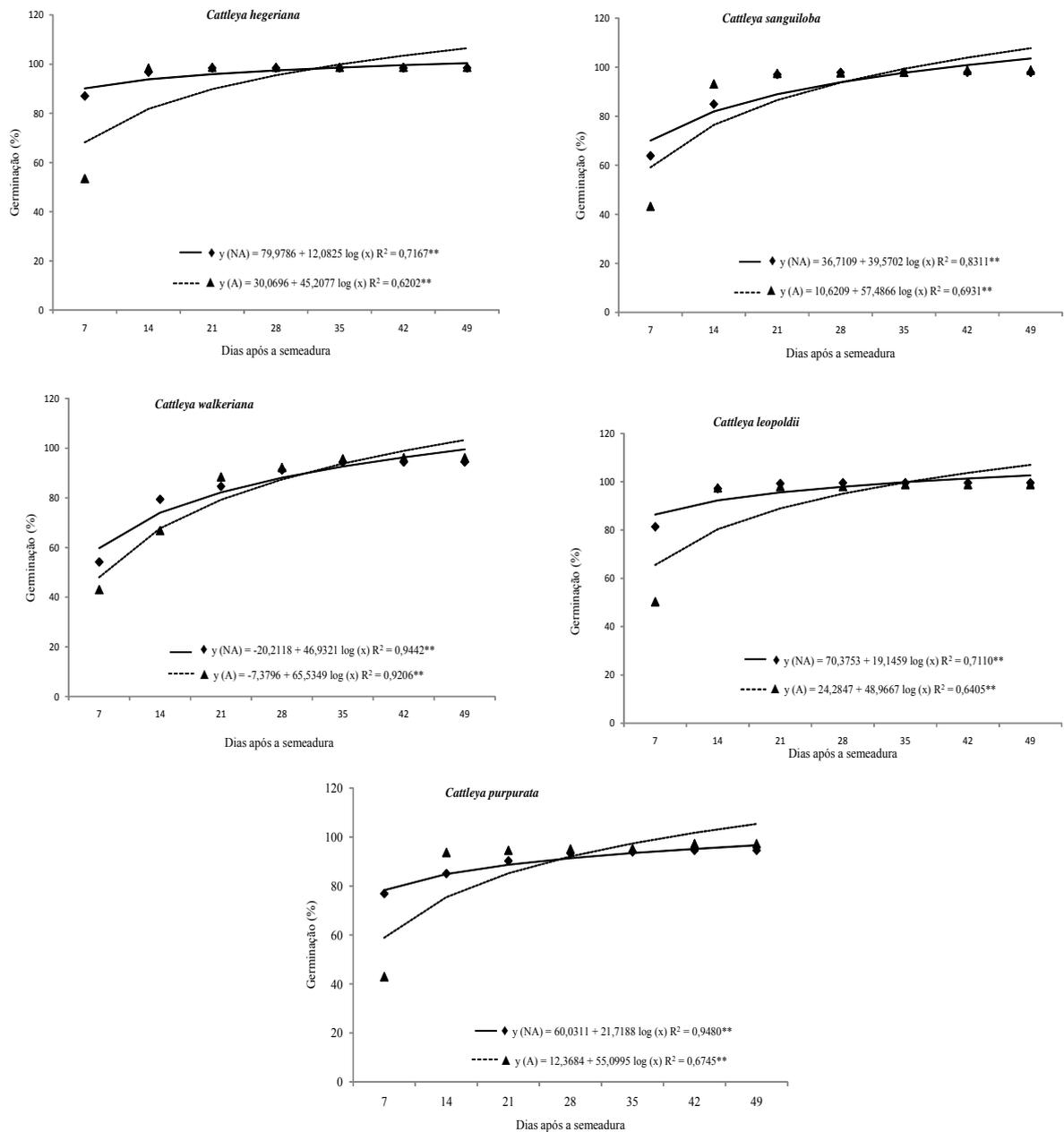
Comparando os valores dos Índices de Velocidade de Germinação (IVG) antes e após o armazenamento a  $-18^{\circ}\text{C}$  (Tabela 3), observou-se que em cinco lotes (*C. intermedia*, *C. hegeriana*, *C. sanguiloba*, *C. leopoldii* e *C. purpurata*) houve diminuição no potencial germinativo, pois ocorreu uma diminuição significativa dos valores de IVG após os três meses de armazenamento. Em *C. granulosa-I* e *C. walkeriana* mantiveram-se os valores, e em *C. tenuis*, *C. granulosa-II* e *C. mossiae*

ocorreu um aumento significativo nos valores de IVG após três meses de armazenamento.

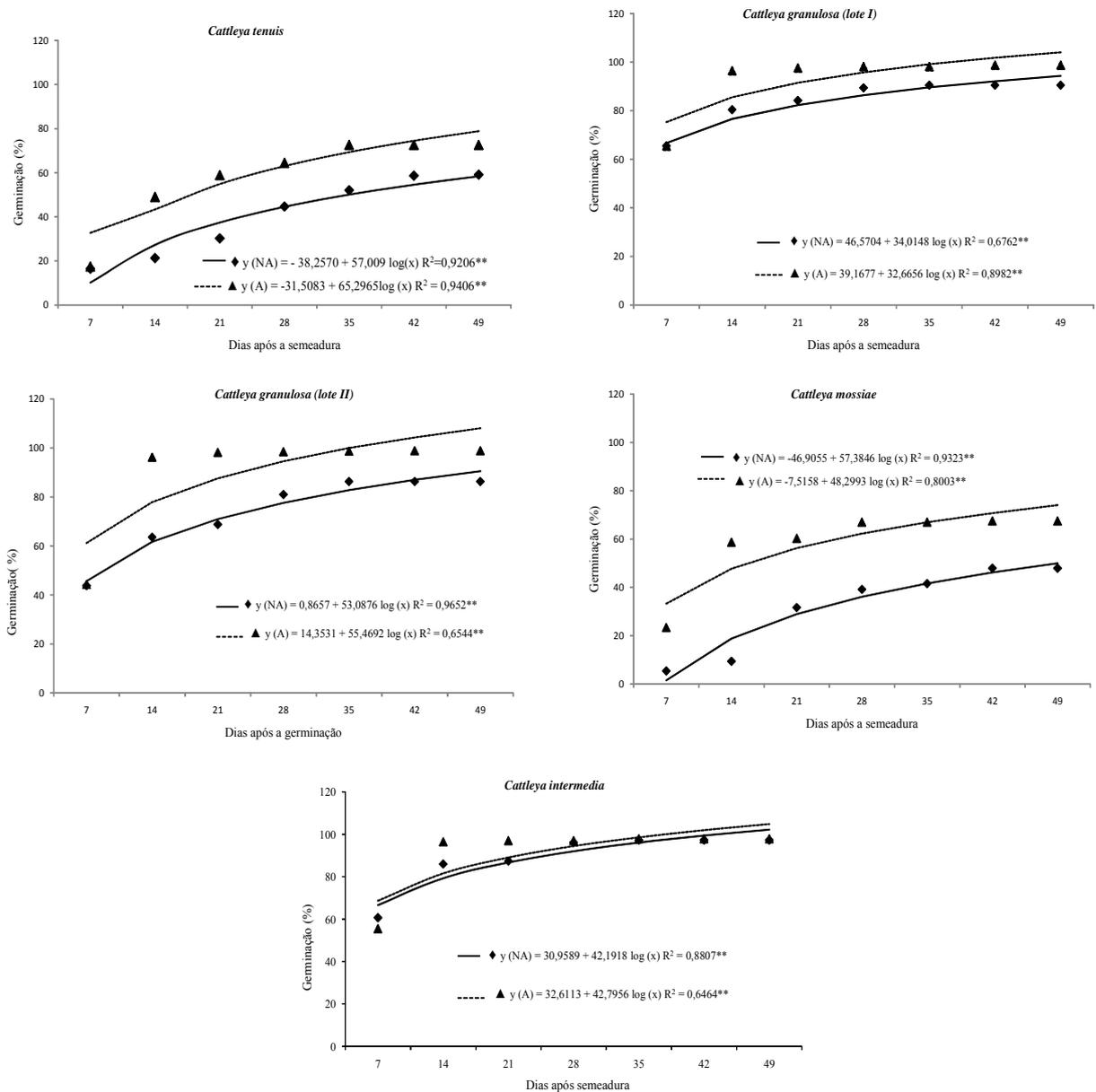
**TABELA 3** - Valores de IVG (Índice de Velocidade de Germinação) de sementes de orquídeas germinadas *in vitro* no início e após três meses de armazenamento a -18°C

Amostras	IVG	
	Início	Após 3 meses
<i>C. intermédia</i>	12,9365 <sup>a</sup>	10,0514 <sup>b</sup>
<i>C. tenuis</i>	4,0108 <sup>b</sup>	5,6468 <sup>a</sup>
<i>C. hegeriana</i>	13,2103 <sup>a</sup>	10,8609 <sup>b</sup>
<i>C. sanguiloba</i>	11,2383 <sup>a</sup>	9,9858 <sup>b</sup>
<i>C. granulosa-I</i>	10,6127 <sup>a</sup>	11,6524 <sup>a</sup>
<i>C. leopoldii</i>	12,8795 <sup>a</sup>	10,6131 <sup>b</sup>
<i>C. walkeriana</i>	10,1264 <sup>a</sup>	9,1256 <sup>a</sup>
<i>C. purpurata</i>	11,9678 <sup>a</sup>	9,8773 <sup>b</sup>
<i>C. granulosa-II</i>	8,5179 <sup>b</sup>	10,1599 <sup>a</sup>
<i>C. mossiae</i>	2,6129 <sup>b</sup>	6,1986 <sup>a</sup>

\* Médias seguidas pela mesma letra, na horizontal, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.



**FIGURA 6** - Curvas de germinação dos cinco lotes de sementes de orquídeas (*Cattleya hegeriana*, *Cattleya sanguiloba*, *Cattleya walkeriana*, *Cattleya leopoldii* e *Cattleya purpurata*) avaliadas antes do armazenamento (NA) e logo após três meses de armazenamento a  $-18^{\circ}\text{C}$  (A), realizadas em condições assimbióticas em meio de cultura Knudson por um período de 49 dias.  $R^2$  = coeficiente de determinação. Equações ajustadas por regressão logarítmicas significativas ( $P < 0,05$ )



**FIGURA 7** - Curvas de germinação dos cinco lotes de sementes de orquídeas (*Cattleya tenuis*, *Cattleya granulosa* – lote I e II, *Cattleya mossiae* e *Cattleya intermedia*) avaliadas antes do armazenamento (NA) e logo após três meses de armazenamento a  $-18^{\circ}\text{C}$  (A), realizadas em condições assimbióticas em meio de cultura Knudson C por um período de 49 dias.  $R^2$ = coeficiente de determinação. Equações ajustadas por regressão logarítmicas significativas ( $P < 0,05$ )

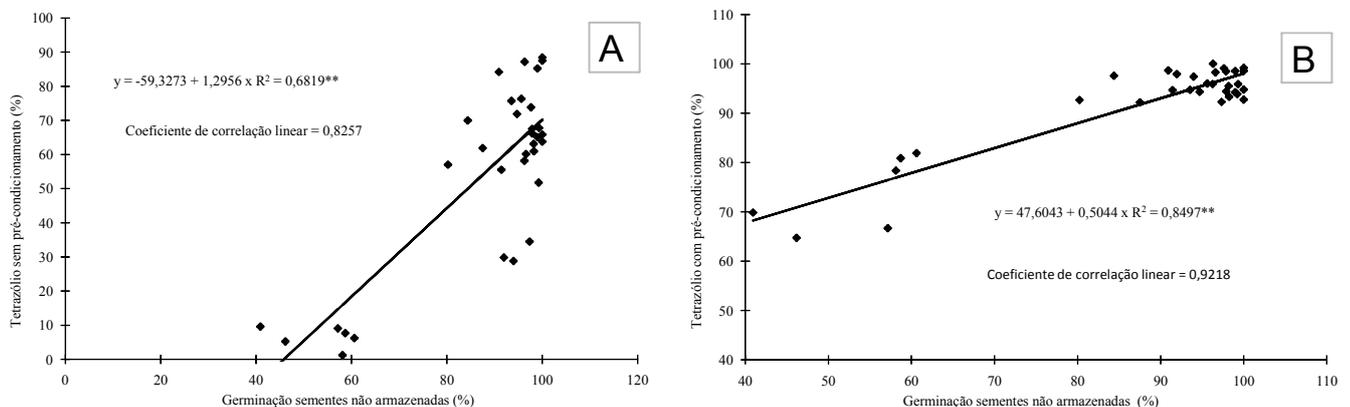
Em relação ao teste de tetrazólio realizado com o pré-condicionamento (Tratamento B) foi possível observar que não houve perda da viabilidade nas sementes armazenadas durante três meses a  $-18^{\circ}$  C. Pelo contrário em *C. intermedia*, *C. walkeriana* e *C. granulosa-II*, observou-se aumento significativo na viabilidade após o armazenamento comparado com a avaliação inicial. Para as demais espécies a diminuição da viabilidade não foi significativa (Tabela 4). Este fato pode estar relacionado a uma alteração da fluidez das membranas celulares do embrião após o processo de congelamento, estimulando vias metabólicas para a quebra de dormência (BEWLEY; BLACK, 1994). Resultados semelhantes foram descritos para as espécies *Angraecum magdalenae*, *Trichopilia tortilis*, *Calanthe vestita* e *Calanthe gorey*, submetidas ao armazenamento em nitrogênio líquido por um período de trinta dias (NIKISHINA et al., 2001). Já para o teste de tetrazólio sem pré-condicionamento, houve uma maior variação nos dados e *C. sanguiloba* apresentou uma perda de viabilidade após o armazenamento. Em seis lotes de sementes (*C. intermedia*, *C. hegeriana*, *C. leopoldii*, *C. walkeriana*, *C. purpurata*, *C. granulosa-II* e *C. mossiae*) houve um aumento de viabilidade após o armazenamento avaliadas pelo tratamento A, já no tratamento B apenas três lotes tiveram o mesmo resultado (*C. intermedia*, *C. walkeriana* e *C. granulosa-I*).

**TABELA 4** - Avaliação da qualidade fisiológica de sementes de orquídeas tropicais pelo teste de tetrazólio. Tratamento A – amostras sem pré-condicionamento e Tratamento B – amostras de sementes pré-condicionadas em solução de sacarose 10%, por 24 horas, no início e após três meses do armazenamento a  $-18^{\circ}$  C

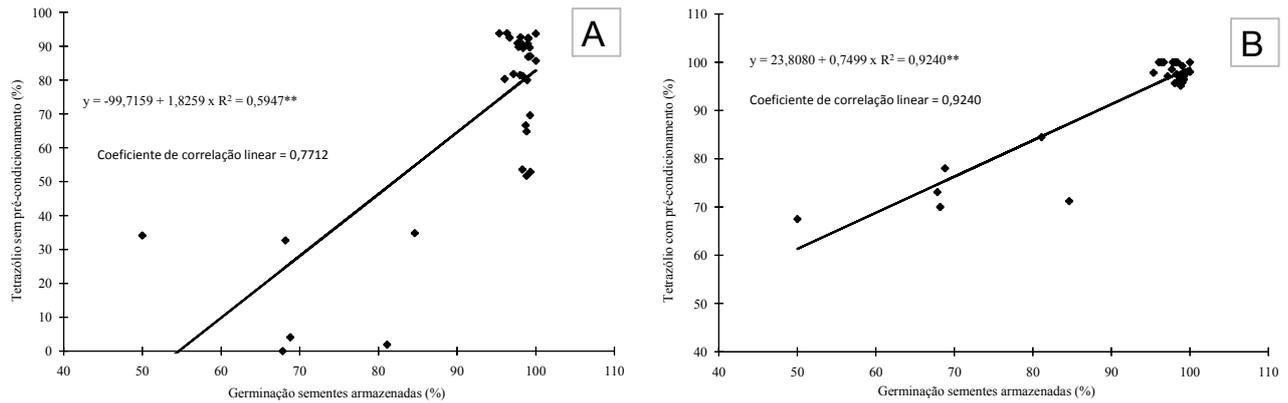
Amostras	Tratamento A		Tratamento B	
	Avaliação inicial (%)	Avaliação após 3 meses (%)	Avaliação inicial (%)	Avaliação após 3 meses (%)
<i>C. intermedia</i>	65 <sup>b</sup>	92 <sup>a</sup>	94 <sup>b</sup>	97 <sup>a</sup>
<i>C. tenuis</i>	2 <sup>a</sup>	5 <sup>a</sup>	80 <sup>a</sup>	79 <sup>a</sup>
<i>C. hegeriana</i>	60 <sup>b</sup>	92 <sup>a</sup>	94 <sup>a</sup>	96 <sup>a</sup>
<i>C. sanguiloba</i>	63 <sup>a</sup>	53 <sup>b</sup>	96 <sup>a</sup>	98 <sup>a</sup>
<i>C. granulosa-I</i>	80 <sup>a</sup>	83 <sup>a</sup>	99 <sup>a</sup>	99 <sup>a</sup>
<i>C. leopoldii</i>	87 <sup>a</sup>	88 <sup>a</sup>	99 <sup>a</sup>	99 <sup>a</sup>
<i>C. walkeriana</i>	31 <sup>b</sup>	93 <sup>a</sup>	96 <sup>b</sup>	99 <sup>a</sup>
<i>C. purpurata</i>	75 <sup>b</sup>	81 <sup>a</sup>	95 <sup>a</sup>	98 <sup>a</sup>
<i>C. granulosa-II</i>	58 <sup>b</sup>	67 <sup>a</sup>	93 <sup>b</sup>	96 <sup>a</sup>
<i>C. mossiae</i>	8 <sup>b</sup>	34 <sup>a</sup>	67 <sup>a</sup>	70 <sup>a</sup>

\* Médias seguidas pela mesma letra, na horizontal, dentro dos tratamentos, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O uso da sacarose no pré-condicionamento melhorou a coloração das sementes permitindo a melhor visualização das sementes viáveis (Figuras 1 e 2), maior porcentagem de viabilidade (Tabela 4), além de apresentar uma maior correlação com os testes de germinação realizados com sementes antes e após o armazenamento a  $-18^{\circ}\text{C}$  (Figuras 8 e 9). Para Gratapaglia e Machado (1998), o tipo e a concentração dos açúcares são importantes para promover a germinação e o crescimento de plântulas *in vitro*, assim como a própria manutenção de crescimento da raiz. Isso pode ser indicativo de que a presença da solução de sacarose foi importante para ativar o metabolismo dos embriões, aumentando a respiração celular e, desta forma, permitindo uma melhor coloração das sementes viáveis.



**FIGURA 8** - A - Correlação entre a viabilidade analisada pelo teste de tetrazólio (Tratamento A) e o teste de germinação de sementes não armazenadas; B - Correlação entre a viabilidade analisada pelo teste de tetrazólio (Tratamento B) e o teste de germinação de sementes não armazenadas. Coeficiente de correlação linear significativo pelo teste *t*.  $R^2$  = coeficiente de determinação



**FIGURA 9** - A - Correlação entre a viabilidade analisada pelo teste de tetrazólio (Tratamento A) e o teste de germinação de sementes armazenadas por um período de três meses a  $-18^{\circ}$  C; B - Correlação entre a viabilidade analisada pelo teste de tetrazólio (Tratamento B) e o teste de germinação de sementes armazenadas por um período de três meses a  $-18^{\circ}$  C. Coeficiente de correlação linear significativo pelo teste *t*.  $R^2$ = coeficiente de determinação

No início do armazenamento o coeficiente de correlação linear entre os testes de germinação e tetrazólio sem pré-condicionamento foi de 0,8257 e o coeficiente de correlação linear com o pré-condicionamento em solução de sacarose foi de 0,9218. Logo após o armazenamento a diferença entre os coeficientes de correlação linear apresentou-se maior, entre os testes de germinação e tetrazólio sem pré-condicionamento foi de 0,7712 e o coeficiente de correlação linear com o pré-condicionamento em solução de sacarose foi de 0,9240.

Segundo Arditti (1992), quando a germinação das sementes ocorre sob condições assimbióticas, o desenvolvimento do protocórmio se faz de forma similar, desde que seja adicionada ao meio de cultura uma fonte adequada de carboidratos, o que explica a ativação do embrião pela sacarose.

O uso da sacarose torna-se importante também pela dificuldade de manipulação das sementes de orquídea, devido ao seu diminuto tamanho, que inviabiliza a utilização de rolos de papel como acontece para sementes de grandes culturas como soja e feijão (KRZYZANOWSKI, et al., 1999). Isto ocorre porque a solução de sacarose mantém um maior equilíbrio osmótico entre a semente e o meio externo, impedindo que a embebição em água direta cause injúrias ao seu tegumento.

Outro aspecto importante em relação ao uso da sacarose está relacionado ao fato da solução servir como um “colchão” para separar as sementes

de maior densidade, as quais contêm embriões com maior viabilidade (JORDÃO, et al., 1998; PICOLO, et al., 2007), excluindo desta forma as sementes inviáveis durante o processo de lavagem.

Quando submete-se as sementes diretamente à solução de tetrazólio, sem pré-condicionamento, boa parte delas flutuam ou aderem às paredes dos microtubos, diminuindo a área de contato com a solução de tetrazólio pois, dependendo da espécie ocorre a presença de um espaço de ar interno (ARDITTI, 1992), desta forma as sementes colorem-se fracamente.

### **3.4 Conclusões**

A análise da viabilidade das sementes submetidas aos testes de tetrazólio e germinação através da digitalização de imagens mostrou-se eficiente pela praticidade e controle das contagens.

Após três meses de armazenamento a  $-18^{\circ}$  C não houve perda da viabilidade das sementes de orquídeas, analisadas pelo teste de germinação e pelos testes de tetrazólio, mas houve uma diminuição na velocidade de germinação de cinco lotes (*C. intermedia*, *C. hegeriana*, *C. sanguiloba*, *C. leopoldii* e *C. purpurata*).

O teste de tetrazólio com pré-condicionamento em solução de sacarose demonstrou maior correlação com o teste de germinação.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ALVAREZ-PARDO, V.; FERREIRA, A. G.; NUNES, V. F. Seed disinfestation methods for in vitro cultivation of epiphyte orchids from southern Brazil. **Horticultura Brasileira**, Campinas v. 24, n. 2, p. 217-220, 2006.

ARDITTI, J. **Fundamentals of orchid biology**. New York: John Wiley & Sons, 1992. 691 p.

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

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](http://www.mma.gov.br/estruturas/ascom_boletins/_arquivos/83_19092008034949.pdf)>. Acesso em: 16 jan. 2008.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: Physiology of Development and Germination**. 2.ed. New York: Plenum Press, 1994. 445 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análises de sementes**. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 1992. 365 p.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 3.ed. Campinas: Fundação Cargill, 2000. 588 p.

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

DAVIDE, A. C. et al. Avaliação da viabilidade de sementes de pau-pereira (*Platycyamus regnellii*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SEMENTES, 5., 1995, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: ABRATES, 1995. p. 178.

DORNELAS, M. C.; LOBO, C. A.; VIEIRA, I. G. Avaliação do tamanho de plântulas de *Eucalyptus spp.* após a germinação, com a utilização de análises de imagens digitais auxiliada por computador. **Scientia Florestalis**, Piracicaba, n. 68, p. 125-130, 2005.

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

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 255-258.

FERREIRA, R. A. et al. Morfologia de sementes e plântulas e avaliação da viabilidade da semente de sucupira-branca (*Pterodon pubescens* Benth. Fabaceae) pelo teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 23, n. 1, p. 108-115, 2001.

GRATAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SP / Embrapa CNPH, 2001.

JORDÃO, L. R.; LOPES, V. B.; TAKAKI, M. Selection of viable seeds in *Hormidium coriaceum* Ldl. (Orchidaceae) by density separation. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 16, p. 515-519, 1988.

KNUDSON, L. A new nutrient solution for the germination of orchid seed. **American Orchid Society Bulletin**, West Palm Beach, v. 15, p. 214-217, 1946.

KRZYZANOWISKI, F. C.; VIEIRA, R. D. ; FRANÇA NETO, J. B. **Vigor de Sementes: Conceitos e Testes**. Londrina: ABRATES, 1999. 218 p.

MACHADO NETO, N. B.; CUSTÓDIO, C. C. A medium for non-commercial sowing of orchid seed. **Selbyana**, Sarasota, 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**, Sarasota, v. 26, n.1-2, p. 229-235. 2005b.

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.

MALAVASI, M. M. et al. Avaliação da viabilidade de sementes de *Dipteryx alata* Voq. - Fabaceae (baru) através do teste de tetrazólio. In: SEMINÁRIO PANAMERICANO DE SEMILLAS, 15.; WORKSHOP SOBRE MARKETING EM SEMENTES E MUDAS, 3., 1996, Gramado. **Anais...** Gramado: CESM/FELAS, 1996. p. 43.

MENDONÇA, E. A. F.; RAMOS, N. P.; PAULA, R. C. Viabilidade de sementes de *Cordia trichotoma* (Vellozo) Arrabida ex Steudel (louro-pardo) pelo teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 23, n. 2, p. 64-71, 2001.

NIKISHINA, T. V. et al. Effect of cryoconservation on seed germination of rare tropical orchids. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 48, n. 6, p. 810-815, 2001.

OLIVEIRA, L. M. **Avaliação da qualidade de sementes de *Tabebuia serratifolia* Vahl Nich. e *T. impetiginosa* (Martius Ex A. P. de Candolle Standley) envelhecidas natural e artificialmente.** 2004. 160 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.

PICCOLO, M. R. et al. Separação de sementes viáveis de orquídeas através de gradientes de concentração de sacarose. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 58., 2007, São Paulo. **Anais...** São Paulo, 2007.

PIÑA-RODRIGUES, F. C.; FIGLIOLIA, M. B.; PEIXOTO, M. C. Teste de qualidade. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. (Org.). **Germinação** – do básico ao aplicado. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 283- 297.

PRITCHARD, H. W.; SEATON, P. T. Orchid seed storage: Historical perspective, current status, and future prospects for long- term conservation. **Selbyana**, Sarasota, v. 14, p. 89-104, 1993.

SANTOS, M. F. et al. Avaliação da qualidade sanitária e fisiológica das sementes de caroba (*Cybistax antisyphilitica* (Mart.) Mart.). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 20, n. 1, p. 1-6, 1998.

Secretaria da Meio Ambiente do Estado de Minas Gerais. **Lista das Espécies Presumivelmente Ameaçadas de Extinção da Flora do Estado de Minas Gerais.** 1997. Disponível em: <[www.biodiversitas.org.br/listasmg/MG-especies-presumivelmente-ameacadas.pdf](http://www.biodiversitas.org.br/listasmg/MG-especies-presumivelmente-ameacadas.pdf)>. Acesso em: 15 mar. 2009.

Secretaria do Meio Ambiente do Estado do Rio Grande do Sul. **Lista da Flora Ameaçada de Extinção do Rio Grande do Sul (Secretaria do Meio Ambiente do Estado do Rio Grande do Sul)**. Desenvolvido pela PROCERGS, 2002. Disponível em: < <http://www.sema.rs.gov.br/sema/html/especextr1.htm> >. Acesso em: 16 jan. 2008.

Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo. Resolução SMA - 48 Lista Oficial das Espécies da Flora do Estado de São Paulo Ameaçadas de Extinção. **Diário Oficial**. São Paulo, SP, 23 set. 2004. p. 114. 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](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. 2009.

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.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática** - Guia ilustrado para identificação das Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II. 2. São Paulo: Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. 703 p.

TEIXEIRA, E. F. **Análise de imagens digitais na avaliação de plântulas de milho**. 2004. 73 f. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, Piracicaba.

VAN DEN BERG, C.; CHASE, M. W. Nomenclatural notes on Laellinae – I. **Lindleyana**, London, v. 15, n. 2, p. 115-119, 2000.

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