

**ARMAZENAMENTO DE SEMENTES DE ORQUÍDEAS EM DIFERENTES  
CONDIÇÕES DE TEMPERATURA E UMIDADE**

**MARIANE MARANGONI HENGLING**

**ARMAZENAMENTO DE SEMENTES DE ORQUÍDEAS EM DIFERENTES  
CONDIÇÕES DE TEMPERATURA E UMIDADE**

**MARIANE MARANGONI HENGLING**

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

Orientadora:

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

635.934 4 Hengling, Mariane Marangoni  
H488a Armazenamento de sementes de orquídeas em  
diferentes condições de temperatura e umidade /  
Mariane Marangoni Hengling. – Presidente  
Prudente, 2015.  
(75)f.: il.

Dissertação (Mestrado em Agronomia) -  
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste,  
Presidente Prudente, SP, 2015.  
Bibliografia.  
Orientador: Ceci Castilho Custódio

1. Orquídea. 2. Germinação. I. Título.

**MARIANE MARANGONI HENGLING**

**ARMAZENAMENTO DE SEMENTES DE ORQUÍDEAS EM DIFERENTES  
CONDIÇÕES DE TEMPERATURA E UMIDADE**

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

Presidente Prudente, 01 de outubro de 2015.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dra. Ceci Castilho Custódio  
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste  
Presidente Prudente-SP

---

Prof. Dr. Ricardo Tadeu de Farias  
Universidade Estadual de Londrina - UEL  
Londrina - PR

---

Prof. Dra. Patricia Reiners Carvalho  
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste  
Presidente Prudente-SP

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho aos meus pais, José e Helena, que me apoiaram desde o início me dando suporte para que tudo culminasse com bons resultados, aos meus professores que me incentivaram e a todos os meus amigos e familiares que não me deixaram fraquejar, me convencendo que eu era capaz.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus e aos mentores espirituais que sempre me amparam em todas as minhas decisões e me regam de bênçãos pra que tudo saia correto.

Não menos importante que Eles, meus pais, José e Helena e meu irmão Adolfo por me apoiarem desde o início, dando suporte para que um sonho se concretizasse.

À minha orientadora Ceci que me acolheu e não mediu esforços para poder me auxiliar com seus conhecimentos, e aos professores Nelson e Silvério por compartilharem comigo informações durante todo o trabalho, sem elas eu ainda estaria quebrando a cabeça.

Às minhas tias e meus avós que rezam por mim e torcem pelo meu futuro.

Aos meus amigos, que são muitos pra enumerar, mas todos têm o meu carisma por terem me auxiliado em algum momento da realização deste projeto, mesmo na fase final, na hora da formatação, quem esteve comigo passando apertos e me acalmando, me dando palavras de esperança.

A toda a equipe do laboratório, sem as quais eu não faria metade porque estaria ainda arrumando a bagunça que fiz algumas vezes. A Cristiane por me ajudar até em momentos que pareciam que eu não iria dar conta, obrigada pela força.

Às minhas companheiras de moradia que se preocupavam por eu chegar tarde e por não dormir e por me apoiarem a continuar de pé.

Sou grata a todos, sem exceção, por toda ajuda, por suportar meu estresse, minha ausência, meu monólogo sobre como estava difícil e eu queria desistir e na manhã seguinte continuava em frente.

Peço que me perdoe se esqueci de alguém ou algum fato, mas não são só com palavras que demonstramos gratidão, lembrarei para sempre deste período da minha vida.

“Aqueles que se sentem satisfeitos sentam-se e nada fazem. Os insatisfeitos são os únicos benfeitores do mundo.”

(Walter S. Landor)

## RESUMO

### Armazenamento de sementes de orquídeas em diferentes condições de temperatura e umidade

Orchidaceae é citada como a maior família vegetal (cerca de 20-25 mil espécies). Algumas espécies têm grande importância econômica, portanto com a intensa degradação de seus habitats, tem resultado na extinção localizada de populações nativas. Uma cápsula dessa família pode conter de centenas a milhares de sementes, com isso, a conservação de sementes pode ser uma estratégia muito importante. Para a análise de qualidade fisiológica e monitoramento da conservação das sementes em armazenamento, o método mais utilizado é o teste de germinação associado ao teste de tetrazólio. A redução da temperatura e da umidade do ar tende a aumentar o período de conservação das sementes. A temperatura de nitrogênio líquido (-196°C) pode proporcionar uma maior preservação, porém essa resposta não é sempre observada. O objetivo foi avaliar a germinação e a viabilidade de quatro espécies de orquídeas do gênero *Cattleya* (*Cattleya purpurata*, *C. tigrina*, *C. amethystoglossa*, *C. brevicaulis*) condicionadas em três níveis de teor de água na semente (1,5, 6,4 e 12%), em três diferentes condições de temperatura do ambiente de armazenamento (5°C, -18°C e -196°C), durante nove meses de armazenamento. Sementes armazenadas foram avaliadas por testes de germinação, índice de velocidade de germinação, teste de tetrazólio e testes para avaliação de danos oxidativos causados pelo período de armazenamento, como, malondialdeído (MDA), peroxidase (PRX), superóxido dismutase (SOD) e proteínas solúveis. O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso com três repetições e arranjo fatorial de tratamentos (combinações dos ambientes de armazenamento e teores de água nas sementes) x períodos de armazenamento. Aplicou-se a análise da variância os tratamentos foram comparados pelo teste de Tukey. Entre todas as condições de armazenamento propostas e teores de água das sementes os melhores resultados indicam que as sementes se mantêm mais viáveis por mais tempo com teores de água de 6,4% e mantidas em nitrogênio líquido. Com exceção de *Cattleya purpurata*, as demais espécies também apresentaram conservação em 5°C e -18°C de armazenamento com teores de água em 6,4%. Os resultados das avaliações bioquímicas indicam que, ao longo do tempo de armazenamento, há perda de viabilidade e alterações nos compostos, mesmo nas sementes conservadas em nitrogênio líquido.

**Palavras Chave:** Orchidaceae; Tetrazólio; *Cattleya*; Germinação.



## ABSTRACT

### Orchid seed storage under different conditions of temperature and humidity

Orchidaceae is cited as the largest plant family (about 20-25 thousand species). Some species have great economic importance, so with the intense degradation of their habitats, has resulted in extinction in native populations. One capsule of this family can contain hundreds to thousands of seeds, seed conservation can be a very important strategy. For the analysis of physiological quality and monitoring of conservation of seed in storage, the most used method is the germination test associated with the tetrazolium test. The reduction of temperature and air humidity tends to increase the shelf-life of seeds. The liquid nitrogen temperature (-196° C) can provide greater preservation, though this response is not always observed. The objective was to evaluate the germination and viability of four species of the Orchid genus *Cattleya* (*Cattleya purpurata*, *C. tigrina*, *C. amethystoglossa*, *C. brevicaulis*) conditioned in three levels of water content in the seed (1.5, 12%), 6.4 and in three different conditions of storage environment temperature (5° C, -18° C and -196° C), for nine months of storage. Stored seed were evaluated for germination tests, index of seed velocity, tetrazolium test and evaluation of oxidative damage caused by storage period, such as malondialdehyde (MDA), peroxidase (PRX), superoxide dismutase (SOD) and soluble proteins. The experimental design was completely random and factorial arrangement of treatments (combined storage temperature and seed moisture) x storage periods. The variance analyses were applied and the treatments were compared by Tukey test. Among all the proposed storage conditions and water content of the seeds the best results highlighted that the seeds remain viable for more time with water levels of 6.4% and kept in liquid nitrogen. With the exception of *C. purpurata*, the other species also presented results for 5° C and -18°C storage with water levels at 6.4%. The biochemical results have shown that over time of storage, there is loss of viability and alterations of compounds, even with seeds conserved in liquid nitrogen.

**Key-words:** Orchidacea; Tetrazolium; *Cattleya*; Germination.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Semeadura realizada em placas de Petri, mantidas em sala de crescimento a $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$ com fotoperíodo de 16 horas.....	25
FIGURA 2	Sementes germinadas com massa embrionária expandida e coloração verde (SEATON E HAILES, 1989).....	26
FIGURA 3	Porcentagem de germinação de <i>Cattleya purpurata</i> armazenadas a $5^{\circ}\text{C}$ com diferentes umidades de sementes, A (1,5%) e B (6,4%).....	31
FIGURA 4	Porcentagem de germinação de <i>Cattleya purpurata</i> armazenadas a $-18^{\circ}\text{C}$ com diferentes umidades de sementes, A (1,5%) e B (6,4%).....	32
FIGURA 5	Porcentagem de germinação de <i>Cattleya purpurata</i> armazenadas a $-196^{\circ}\text{C}$ com diferentes umidades de sementes, A (1,5%), B (6,4%) e C (12%).....	34
FIGURA 6	Porcentagem de germinação de <i>Cattleya tigrina</i> armazenadas a $5^{\circ}\text{C}$ com diferentes umidades de sementes, A (1,5%) e B (6,4%).....	36
FIGURA 7	Porcentagem de germinação de <i>Cattleya tigrina</i> armazenadas a $-18^{\circ}\text{C}$ com diferentes umidades de sementes, A (1,5%), B (6,4%) e C (12%).....	38
FIGURA 8	Porcentagem de germinação de <i>Cattleya tigrina</i> armazenadas a $-196^{\circ}\text{C}$ com diferentes umidades de sementes, A (1,5%), B (6,4%) e C (12%).....	40
FIGURA 9	Porcentagem de germinação de <i>Cattleya amethystoglossa</i> armazenadas a $5^{\circ}\text{C}$ com diferentes umidades de sementes, A (1,5%), B (6,4%) e C (12%).....	42
FIGURA 10	Porcentagem de germinação de <i>Cattleya amethystoglossa</i> armazenadas a $-18^{\circ}\text{C}$ com diferentes umidades de	

	sementes, A (1,5%), B (6,4%) e C (12%).....	44
FIGURA 11	Porcentagem de germinação de <i>Cattleya amethystoglossa</i> armazenadas a -196°C com diferentes umidades de sementes, A (1,5%), B (6,4%) e C (12%).....	46
FIGURA 12	Porcentagem de germinação de <i>Cattleya brevicaulis</i> armazenadas a 5°C com diferentes umidades de sementes, A (1,5%), B (6,4%) e C (12%).....	48
FIGURA 13	Porcentagem de germinação de <i>Cattleya brevicaulis</i> armazenadas a -18°C com diferentes umidades de sementes, A (1,5%), B (6,4%) e C (12%).....	50
FIGURA 14	Porcentagem de germinação de <i>Cattleya brevicaulis</i> armazenadas a -196°C com diferentes umidades de sementes, A (1,5%), B (6,4%) e C (12%).....	52

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Nome das espécies e local de ocorrência dentro do território brasileiro.....	23
TABELA 2	Umidade relativa e teor de água da semente de orquídea em equilíbrio higroscópico no interior do mini dessecador.....	24
TABELA 3	Resultados de germinação (G), índice de velocidade de germinação (IVG) e teste de tetrazólio (TZ) obtidos nas análises preliminares nas sementes de <i>Cattleya purpurata</i> , <i>Cattleya tigrina</i> , <i>Cattleya amethystoglossa</i> e <i>Cattleya brevicaulis</i> .....	30
TABELA 4	Valores de F obtidos na análise da variância dos resultados de germinação (G, %), índice de velocidade de germinação (IVG) e teste de tetrazólio (TZ, %) de sementes condicionadas com 1,5, 6,4 e 12% de teores de água e armazenadas nas temperaturas de 5, -18 e -196°C e avaliadas aos 3, 6 e 9 meses de armazenamento.....	54
TABELA 5	Análise do desdobramento da germinação, índice de velocidade de germinação e teste de tetrazólio para a interação entre tratamentos e períodos de armazenamento de sementes de <i>Cattleya purpurata</i> .....	56
TABELA 6	Análise do desdobramento da germinação, índice de velocidade de germinação e teste de tetrazólio para a interação entre tratamentos e períodos de armazenamento de sementes de <i>Cattleya tigrina</i> .....	58
TABELA 7	Análise do desdobramento da germinação, índice de velocidade de germinação e teste de tetrazólio para a interação entre tratamentos e períodos de armazenamento de sementes de <i>Cattleya amethystoglossa</i> .....	60
TABELA 8	Análise da germinação e do desdobramento do índice de velocidade de germinação e do teste de tetrazólio para a	

	interação entre tratamentos e períodos de armazenamento de sementes de <i>Cattleya brevicaulis</i> .....	62
TABELA 9	Análise da determinação de proteínas solúveis totais (Prot Sol), atividade de superóxido dismutase (SOD), peroxidase (PRX) e conteúdo de malondealdeído (MDA) em sementes de <i>Cattleya purpurata</i> em tratamentos constituídos pela combinação de temperaturas de armazenamento e teores de água na semente.....	64
TABELA 10	Análise da determinação de proteínas solúveis totais (Prot Sol), atividade de superóxido dismutase (SOD), peroxidase (PRX) e conteúdo de malondealdeído (MDA) em sementes de <i>Cattleya tigrina</i> em tratamentos constituídos pela combinação de temperaturas de armazenamento e teores de água na semente.....	65
TABELA 11	Análise da determinação de proteínas solúveis totais (Prot Sol), atividade de superóxido dismutase (SOD), peroxidase (PRX) e conteúdo de malondealdeído (MDA) em sementes de <i>Cattleya amethystoglossa</i> em tratamentos constituídos pela combinação de temperaturas de armazenamento e teores de água na semente.....	66
TABELA 12	Análise da determinação de proteínas solúveis totais (Prot Sol), atividade de superóxido dismutase (SOD), peroxidase (PRX) e conteúdo de malondealdeído (MDA) em sementes de <i>Cattleya brevicaulis</i> em tratamentos constituídos pela combinação de temperaturas de armazenamento e teores de água na semente.....	67

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>16</b>
<b>3</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>17</b>
<b>3.1</b>	<b>Propagação de orquídeas</b> .....	<b>17</b>
<b>3.2</b>	<b>Tipos de sementes de orquídeas</b> .....	<b>18</b>
<b>3.3</b>	<b>Bancos de germoplasma de orquídeas</b> .....	<b>19</b>
<b>3.4</b>	<b>Germinação e vigor de sementes de orquídeas</b> .....	<b>20</b>
<b>3.5</b>	<b>Testes bioquímicos para avaliar viabilidade de sementes armazenadas</b> .....	<b>21</b>
<b>4</b>	<b>MATÉRIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>23</b>
<b>4.1</b>	<b>Sementes</b> .....	<b>23</b>
<b>4.2</b>	<b>Umidade relativa</b> .....	<b>23</b>
<b>4.3</b>	<b>Ambientes de armazenamento</b> .....	<b>24</b>
<b>4.4</b>	<b>Teste de tetrazólio</b> .....	<b>24</b>
<b>4.5</b>	<b>Teste de germinação</b> .....	<b>25</b>
<b>4.6</b>	<b>Testes bioquímicos</b> .....	<b>26</b>
<b>4.6.1</b>	<b>Superóxido dismutase (SOD)</b> .....	<b>26</b>
<b>4.6.2</b>	<b>Proteínas solúveis</b> .....	<b>26</b>
<b>4.6.3</b>	<b>Peroxidase (PRX)</b> .....	<b>27</b>
<b>4.6.4</b>	<b>Malondialdído (MDA)</b> .....	<b>27</b>
<b>4.7</b>	<b>Expressão dos resultados</b> .....	<b>27</b>
<b>4.8</b>	<b>Análise estatística</b> .....	<b>28</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>29</b>
<b>5.1</b>	<b>Análises de germinação, IVG e teste de tetrazólio</b> .....	<b>29</b>
<b>5.2</b>	<b>Análises bioquímicas</b> .....	<b>63</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>68</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>70</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>71</b>

## 1 INTRODUÇÃO

*Orchidacea* é considerada a maior família de vegetais, com cerca de 10% das angiospermas do mundo, atingindo cerca de 35 mil espécies. Podem ser encontradas em vários ambientes, em todo o planeta, com capacidade de crescer no solo, sobre pedras e árvores. A exploração do seu habitat e intensa extração sem cuidado vem provocando aumento do perigo de extinção de algumas espécies e até mesmo a extinção de muitas delas.

Estas flores apresentam uma infinidade de usos, como, plantas de corte, plantas de vaso, indústria de alimentos (*Vanilla planifolia*, como a baunilha), peças de colecionadores, reconstituição de matrizes entre outros. Algumas mais importantes apresentam valores ornamentais, como, as *Cattleyas*, *Dendrobium* e *Phalaenopsis*.

A descoberta de reprodução assexuada de orquídeas por Knudson em 1921 foi o primeiro passo para a reprodução *in vitro* destas plantas, mais tarde surgiram meios de culturas apropriados para o cultivo e a produção em larga escala das espécies. Há várias formas de reproduzir orquídeas, como touceiras, pseudobulbos entre outros, mas são formas que demoram a formar novas plantas. A reprodução sexuada é mais difícil para fins comerciais, pois além de haver milhares de sementes em uma cápsula o fenótipo não será igualmente reproduzido das matrizes, uma aplicação da biotecnologia é a reprodução assexuada por meristemas e/ou tecidos para obter clones em larga escala.

Para fins de conservação de espécies, a preservação através das sementes é uma das maneiras possíveis, pois uma única planta pode fornecer um número muito grande de propágulos que podem ser armazenados em frascos pequenos e mantidos em ambientes com condições controladas a custos relativamente baixos. No entanto, as sementes, por serem muito pequenas, possuem muitos pontos para serem estudados em relação a temperaturas e umidades relativas de ambientes de conservação, classificação em ortodoxas e recalcitrantes e ocorrência de dormência, entre outras características.

Acredita-se que temperaturas sub-zero sejam ideais para armazenamento de sementes a longo prazo como em bancos de germoplasma para conservação e armazenamento de espécies. Alguns estudos indicam que ambientes de nitrogênio líquido sejam mais apropriados, devido ao congelamento imediato não

formar cristais de gelo dentro das células, com isto, não há ruptura de membranas e, então, a viabilidade das sementes são mantidas. Estas estratégias necessitam ainda ser avaliadas, pois sementes de orquídeas podem ser consideradas ortodoxas, ou seja, suportam dessecação até níveis de 2% de teor de água nas sementes e temperaturas baixas.

Para avaliar os melhores métodos de armazenamento são empregados testes que permitem quantificar a germinação assimbiótica e teste rápido de viabilidade como o tetrazólio, onde é possível verificar a partir da atividade enzimática no embrião os tecidos vivos de cada semente individualmente. Alguns testes de atividades enzimáticas e de detecção de metabólitos intermediários também podem ser aplicados a fim de detectar o nível de deterioração sofrido por cada espécie em cada condição de armazenamento de semente.



## 2 OBJETIVOS

Avaliar a germinação e a viabilidade de quatro espécies de orquídeas do gênero *Cattleya* (*Cattleya purpurata*, *C. tigrina*, *C. amethystoglossa*, *C. brevicaulis*) condicionadas em três níveis de teor de água na semente (1,5, 6,4 e 12%), em três diferentes condições de temperatura do ambiente de armazenamento (5°C, -18°C e -196°C), durante nove meses de armazenamento.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Orchidaceae é citada como a maior família vegetal (cerca de 20-25 mil espécies), representando cerca de 10% de todas as espécies de Angiospermas (BENZING, 1981; ATWOOD, 1986; DRESSLER, 2005). Podem ser encontradas em todas as regiões do planeta, mas com grande predominância de espécies e indivíduos em regiões tropicais, crescendo diretamente sobre o solo, pedras ou, principalmente, como epífitas (DRESSLER, 2005; HOSSAIN et al., 2013).

Paralelamente a estudos evolutivos em populações naturais, ocorreu um aumento na exploração comercial de espécies desta família; em virtude do valor ornamental. Por esse motivo vêm sendo intensamente exploradas, o que, juntamente com a degradação de seus habitats, tem resultado na extinção localizada de populações nativas (HOSOMI, 2009; SILVA, 1977; KOOPOWITZ, 2001). Há pelo menos cinco vertentes de como as orquídeas podem ser usadas com valores comerciais: flores de corte, plantas de vaso, flores para exposição e constituição de matrizes, plantas de colecionadores e plantas de jardim (BARBIERI; SUMPFF, 2008). Algumas espécies têm grande importância econômica, um exemplo é a essência de baunilha extraída dos frutos de *Vanilla planifolia*; algumas outras espécies possuem alto teor ornamental, como por exemplo, as *Cattleyas*, *Phalaenopsis* e *Dendrobium*, entre outras (JUDD et al., 2009).

#### 3.1 Propagação de orquídeas

O cultivo de orquídeas como plantas ornamentais se iniciou na Europa por volta do século XIX; os espécimes sobreviventes eram multiplicados por divisões ou por sementes, e geravam poucos descendentes (KNUDSON, 1992). Em 1943 (KNUDSON, 1943) houve o estabelecimento de soluções nutritivas para cultura de plantas, mas foi somente em 1946 que um meio eficiente para germinação *in vitro* de *Cattleya* e alguns outros gêneros foi descrito. Com isso a propagação em larga escala via sementes aumentou a multiplicação destas plantas e o melhoramento das mesmas (HOSOMI, 2009).

Existem vários sistemas de propagação de orquídeas, sendo que por meios assexuados esta pode ser feita por divisão de touceiras, pseudobulbos,

bulbos velhos, entre outros. Esses métodos, apesar de simples, podem demorar em formar uma nova planta adulta (CAMPOS, 1998; SILVA, 1977). Quanto à reprodução sexuada, esta é mais incomum de ser utilizada para fins comerciais, uma vez que uma cápsula pode conter de centenas a milhares de sementes que não reproduzem o fenótipo original, portanto são utilizados métodos de estabelecimento *in vitro*, por meristema, que embora o custo seja muito elevado, a propagação é mais segura reproduzindo o fenótipo comercialmente desejado (BACH; CASTRO, 2004). No entanto, quando o interesse é conservação de espécies, a propagação por sementes é a única alternativa.

### **3.2 Tipos de sementes de orquídeas**

Sugere-se que as sementes de orquídeas apresentam comportamento semelhante aos das sementes ortodoxas (PRITCHARD; SEATON, 1993; PRITCHARD; POINTER; SEATON, 1999). A fase de desidratação natural deve coincidir com a estação seca do clima e/ou com a suspensão da irrigação, minimizando os prejuízos à qualidade das sementes (TOLEDO; MARCOS FILHO, 1977). Essa fase pode ser interpretada como uma adaptação estratégica das sementes para torná-las aptas a sobreviverem após o armazenamento, além de garantir melhor disseminação das espécies e prover-lhes tolerância às severas condições ambientais (LEOPOLD, 1990 apud GUIMARÃES, 2000). A maioria possui sementes que toleram dessecação a graus de umidade próximos de 2% a 5%, ou mesmo abaixo desses níveis (FONSECA; FREIRE, 2003).

Apesar de algumas orquídeas ameaçadas de extinção poderem ser propagadas em meio apropriado *in vitro* a partir de sementes (LONG et al., 2010; DUTRA; KANE; RICHARDSON, 2009, ÁVILA-DIAZ et al., 2009) esta não é uma estratégia fácil de seguir para todos os táxons. Além disso, as sementes de algumas espécies não podem ser armazenadas a baixas temperaturas e umidade, pois expressam características intermediárias ou recalcitrantes, não tolerando dessecação e baixas temperaturas (MACHADO NETO; CUSTÓDIO, 2005). Ao contrário das sementes ortodoxas, essas sementes são liberadas com alto teor de umidade, cerca de 60 a 70% do seu peso fresco (na fase de maturação fisiológica) (KIKUTI, 2000).

A vitalidade dessas sementes pode ser favorecida com a adequação do período de coleta dos frutos e com as reduções do teor de água das sementes, da temperatura e da pressão de oxigênio na atmosfera de armazenamento (SEATON; PRITCHARD, 1990; THORNHILL; KOOPOWITZ, 1992; MELLO, 2000).

Para as sementes ortodoxas, a secagem e o armazenamento são, possivelmente, os fatores mais importantes na preservação da sua viabilidade e, conseqüentemente, na obtenção de mudas com desenvolvimento satisfatório. Assim, durante o armazenamento, um dos aspectos a serem considerados para manutenção da viabilidade é o teor inicial de água das sementes (BRAZ; ROSSETTO, 2008). O alto teor de água pode afetar a qualidade da semente no período de armazenamento, portanto, a secagem apresenta-se como uma exigência para garantir a qualidade da semente (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000).

Sementes com teor inicial de água de 8-10% apresentam menor deterioração, independente dos outros fatores envolvidos, como a temperatura (T) e a umidade relativa (UR) do ar (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000). Porém, independente do teor de água considerado, a redução da temperatura do ar tende a aumentar o período de conservação das sementes (GENTIL et al., 2001).

### **3.3 Bancos de germoplasma de orquídeas**

Em bancos de germoplasma a viabilidade das sementes deve ser mantida pelo maior período possível, por outro lado a preservação da identidade genética da espécie é um aspecto de grande importância. Este tipo de armazenamento exige maiores cuidados, pois nele se utilizam baixas temperaturas e baixa umidade relativa do ar (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000).

O uso de bancos de sementes, para conservação *ex situ* de germoplasma de orquídeas depende de disponibilidade de conhecimentos, capazes de permitir a definição de temperaturas e graus de umidade para o armazenamento (PRITCHARD; SEATON, 1993). Segundo Stanwood (1985), sementes armazenadas a temperatura de nitrogênio líquido (-196°C) têm uma preservação maior gerando uma diminuição da deterioração das mesmas, pois a umidade é um fator importante, a presença de água nas sementes reduz consideravelmente a capacidade de germinação após o armazenamento, pois os cristais de gelo formados são muito

pequenos e não conseguem perfurar as membranas celulares (HOSSAIN et al., 2013).

Segundo Vendrame et al (2014) outros métodos, como a criopreservação, com uso de crioprotetores e técnicas, algumas em desenvolvimento, podem ser utilizados para o armazenamento de sementes, protocórmios, pólen, meristemas, entre outros tecidos. Para o autor estas técnicas permitem explorar melhores meios de armazenar materiais biológicos e evitar perda de informações genéticas de espécies em extinção, por exemplo.

### **3.4 Germinação e vigor de sementes de orquídeas**

Para ocorrer germinação, as sementes necessitam alcançar nível adequado de hidratação, que permita a reativação do metabolismo e, conseqüentemente, o crescimento do eixo embrionário, sendo que, quanto maior a quantidade de água disponível, mais rápida será a absorção (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000; FERREIRA; BORGHETTI, 2004; MARCOS FILHO, 2005). Quando há perda do nível de vigor das sementes a capacidade de germinação é afetada, com isso, ocorre uma deterioração das estruturas morfológicas e bioquímicas, não possuindo capacidade para restaurar os tecidos injuriados. A água absorvida no início da germinação ativa o metabolismo da semente, se houver muitos danos nos tecidos a recuperação é mais demorada e a qualidade das plantas podem ser danificadas (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000).

Para a análise de qualidade fisiológica, o método mais utilizado é o teste de germinação. O período para a realização deste teste, no entanto, pode variar de dias, semanas ou mesmo meses para algumas espécies que apresentam dormência (MARCOS-FILHO, 2005). O período em que uma semente vive é determinado pela sua longevidade, e este é determinado pela interação de fatores genéticos e ambientais (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000).

A longevidade e o vigor inicial de um lote de sementes é influenciado por vários fatores como características genéticas da planta genitora, vigor das progenitoras, condições climáticas durante a maturação das sementes, injúrias mecânicas e armazenamento, além dos fatores ambientais como água, temperatura, luminosidade e presença de nutrientes (FERREIRA; BORGHETTI, 2004).

Para determinar o vigor e a viabilidade de sementes podem ser utilizados vários testes. O desenvolvimento de testes rápidos visando à determinação da qualidade fisiológica de sementes tem sido um dos principais objetivos dos tecnologistas de semente há vários anos (CERVI; MENDONÇA, 2009). Dentre os testes indiretos considerados rápidos, o teste de tetrazólio vem se destacando por ser uma alternativa viável para fornecer informações sobre diversas culturas (FRANÇA-NETO, 1999; GRZYBOWSKI et al., 2012). Este teste permite determinar a viabilidade e o vigor das sementes (o vigor está padronizado apenas para poucas espécies cultivadas) em, no máximo, 48 horas (BHERING et al., 1999). Além disso, o teste de tetrazólio ainda apresenta como vantagens, se comparado ao teste de germinação, a avaliação do embrião individualmente em cada semente, sem ter interferências em seus resultados finais, como a presença de patógenos, como os fungos (CERVI; MENDONÇA, 2009), permitindo uma estimativa mais rápida da capacidade de germinação das sementes (TUNES et al., 2009)

O teste fundamenta-se na alteração da coloração dos tecidos da semente em presença de solução de sal de tetrazólio, devido às atividades das enzimas desidrogenases, durante a respiração. Nesta fase onde ocorre a liberação de íons hidrogênios com os quais o sal 2,3,5 trifenil cloreto de tetrazólio, incolor e solúvel, reage com os tecidos vivos formando uma substância de cor vermelha e insolúvel denominada formazan (DELOUCHE et al., 1976). Tecidos mortos ou muito deteriorados apresentam-se descoloridos (CERVI; MENDONÇA, 2009).

### **3.5 Testes bioquímicos para avaliar viabilidade de sementes armazenadas**

O armazenamento de sementes é importante para fornecer flexibilidade para a comercialização e preservação do germoplasma. A conservação de recursos genéticos é útil para programas de melhoramentos genéticos e estudos para resistência a doenças e pragas. Por outro lado, o armazenamento por longo tempo pode causar danos à viabilidade e até a morte das sementes, detectada pela alteração fisiologia e mecanismos bioquímicos (PRACIAK, 2008).

Durante o armazenamento a deterioração é um processo natural e inevitável de desestruturação física e perda de capacidade fisiológica (NODARI et al., 1998), essa degradação é proveniente de estresses, como por exemplo o

armazenamento, em resposta a estes estresses algumas substâncias químicas podem ocorrer, são atividades de espécies reativas de oxigênio (ROS) (FREI, 1994; MEI et al., 2010). A produção de radicais livres afeta a formação de enzimas, devido modificações em suas estruturas; um dos principais efeitos desses produtos é a degradação do sistema de síntese de novas enzimas. A existência de enzimas removedoras de produtos tóxicos (*scavenger*) permite neutralizar a ação dos radicais livres na degradação de membranas (MARCOS FILHO, 2005), esses processos de detoxicação são características evolutivas no processo de proteção das estruturas celulares (MITTLER, 2002).

Algumas substâncias podem ser encontradas como o malonaldeído (MDA) que é um produto da peroxidação lipídica. A peroxidação lipídica é a causa da deterioração das sementes, ocorre tanto em lipídeos armazenados como nos componentes das membranas causando diminuição da fluidez e permeabilidade iônica, entre outras funções da membrana. A peroxidação atua em sementes com grau de umidade próximo ou superior à 14%, entre os níveis de 6-14% este processo é mínimo devido a proteção das moléculas de água protegendo as enzimas, portanto, torna-se uma ocorrência danosa devido à degradação dos lipídios das membranas, oxidação de aminoácidos, degradação de DNA e proteínas (MARCOS FILHO, 2005).

Uma substância que possui papel importante no combate dos radicais livres são as enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD) (YU; RENGEL, 1999) com a capacidade de catalisar superóxido ( $O_2$ ) para a forma molecular oxigênio e  $H_2O_2$  (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977), quando apresentam atividades mais intensas em fases precoces ou tardias do processo de maturação são indicativos de sua ação de defesa, reduzindo a formação dos radicais livres (MARTINS et al., 2011).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Sementes

Sementes de *C. tigrina*, *C. purpurata*, *C. amethystoglossa* e *C. brevicaulis* foram obtidas no Orquidário Aurora (Taciba - SP).

Todas as espécies estudadas são nativas, tendo suas origens diversas pelo Brasil (Tabela1).

**Tabela 1:** Nome das espécies e local de ocorrência dentro do território brasileiro.

Nome da espécie	Local de ocorrência
<i>Cattleya purpurata</i> *	RS, SP e SC
<i>Cattleya tigrina</i> *	RS, SC, SP, BA, PE, SE
<i>Cattleya amethystoglossa</i> *	BA
<i>Cattelya brevicaulis</i> *	ES, MG

Fonte: Barros, F. et al. *Orchidaceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB11331>>. Acesso em: 03 Fev. 2016.

As cápsulas foram obtidas por polinização cruzada com plantas de diferentes origens. Os frutos foram deixados em sacos de papel de seda e mantidos sob condições ambientais até deiscência completa. As sementes de cada espécie foram limpas manualmente para retirar cascas e palhas, colocadas em sacos de papel fino até atingirem equilíbrio higroscópico em solução saturada de cloreto de lítio a 25°C até alcançarem entre 6 a 6,5% de teor de água.

### 4.2 Umidade relativa

As sementes foram submetidas ao armazenamento com três diferentes graus de umidade obtido por equilíbrio higroscópico (1,5, 6,4 e 12%). Para conseguir alcançar esses valores foram utilizados mini dessecadores com sílica ou diferentes concentrações de cloreto de lítio como indicado na Tabela 2. Após o equilíbrio as sementes foram rapidamente transferidas para tubos hermeticamente selados e mantidas sob sílica em cada ambiente de armazenamento (separadamente para cada espécie e época de avaliação).



**Tabela 2-** Umidade relativa e teor de água da semente de orquídea em equilíbrio higroscópico no interior do mini dessecador.

Solução no interior do mini dessecador	Concentração (g L <sup>-1</sup> )	UR (%)	Teor de água da semente (%)
Cloreto de lítio	17,1	82,3	12
Cloreto de lítio	74,1	15,0	6,4
Sílica gel grânulo puro	-	4,5	1,5

### 4.3 Ambientes de armazenamento

Os ambientes de armazenamento foram determinados para 5°C, -18°C e -196°C. As sementes nos teores de água obtidos após o equilíbrio higroscópico (Tabela 1) foram submetidas a estas temperaturas em frascos hermeticamente selados, mantidos em sílica gel nos ambientes de 5°C e -18°C para evitar alteração nos teores de água; em -196°C as sementes foram armazenadas em micro tubos hermeticamente selados diretamente no nitrogênio líquido.

### 4.4 Teste de tetrazólio

A vitalidade foi avaliada através do teste de Tetrazólio (TZ) modificado, utilizando três repetições por amostra. O pré-condicionamento foi realizado em 2 mg de sementes de cada espécie. Estas foram colocadas em micro tubos de 1,5 mL com solução de sacarose 10% p/v, e deixadas por 24h em temperatura ambiente. A solução foi drenada com micropipeta e lavada duas vezes com água destilada. Uma solução de TZ 1% foi adicionada e os micro tubos foram incubados no escuro a 40°C em banho-maria por 24 horas (HOSOMI et al., 2011). Após o período de incubação, a solução de TZ foi descartada e a solução contendo as sementes foi depositada em uma lâmina de vidro de microscopia e a imagem capturada em um scanner de mesa HP G2710, com uma resolução de 3600 dpi. Para um melhor contraste entre as sementes coloridas um fundo azul foi colado ao lado interno da tampa do scanner foi

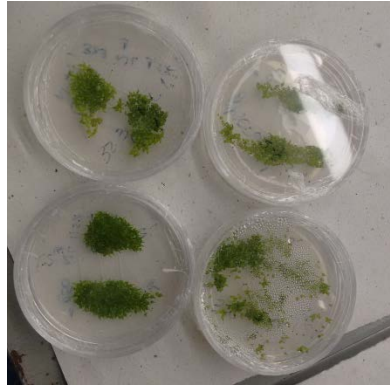
utilizado. A contagem foi feita em computador usando-se o software Adobe Photoshop® CS6. Sementes róseo-vermelhas foram consideradas vivas, enquanto as sementes brancas foram consideradas mortas. O experimento foi avaliado em triplicata para cada espécie.

#### **4.5 Teste de germinação**

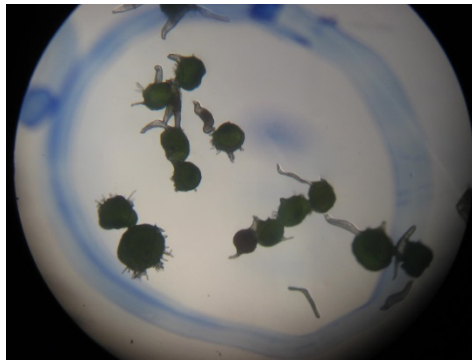
Testes de germinação foram realizados em meio MS meia dose (MURASHIGE; SKOOG, 1962) contendo ágar ( $10 \text{ g L}^{-1}$ ). O pH foi ajustado para 5,6 (com NaOH) antes da autoclavagem, em seguida o meio foi dispensado em placas-de-Petri de 80mm. Antes da semeadura, 5 mg de cada lote de sementes foi desinfetado com uma solução de dicloroisocianurato de sódio (NaDCC;  $5\text{g.L}^{-1}$ ) contendo  $100\mu\text{l}$  de Tween 80, por 10 min. As sementes foram lavadas duas vezes com água destilada estéril e colocadas no meio. A semeadura foi realizada em uma capela de fluxo laminar de acordo com Machado Neto e Custódio (2005). Três placas-de-Petri foram usadas por espécie, seladas com filme de PVC e transferidas para uma sala de crescimento a  $25 \pm 3^\circ\text{C}$  com fotoperíodo de 16 horas (FIGURA 1).

As sementes germinadas foram contadas semanalmente, até completar 35 dias após a semeadura, em três campos marcados em cada placa-de-Petri. As imagens foram capturadas com uma câmera digital Canon A510, acoplada manualmente à lente ocular de um estereomicroscópio, e foram analisadas como descrito acima, as imagens foram analisadas em software de edição de imagens do Windows. As sementes foram consideradas como germinadas quando elas tiveram a massa embrionária expandida e coloração verde (estágio 1) de acordo com o método de Seaton e Hailes (1989) (FIGURA 2).

**FIGURA 1-** Semeadura realizada em placas de Petri, mantidas em sala de crescimento a  $25 \pm 3^\circ\text{C}$  com fotoperíodo de 16 horas.



**FIGURA 2-** Sementes germinadas com massa embrionária expandida e coloração verde (SEATON; HAILES, 1989).



## 4.6 Testes bioquímicos

### 4.6.1 Superóxido dismutase (SOD)

Para análises de enzimas como a SOD foi utilizado tampão fosfato de potássio pH 7,8, para extração foi adicionado polivinilpirrolidona e dithiotheitol com EDTA, para cada 5mg de semente macerada com nitrogênio líquido foram utilizados 1,5mL de tampão extração, centrifugado a 12.000rpm/20minutos em centrifuga refrigerada. O tampão leitura I e II preparado com riboflavina e metionina (tampão I) e NBT (tampão II). A leitura foi realizada com 4,950mL de tampão leitura 50% (I e II) e 50 $\mu\text{L}$  de sobrenadante centrifugado. Os tubos foram mantidos em grades cobertas de papel alumínio sob luz fluorescente a  $25^\circ\text{C}/20\text{min}$ . A leitura foi realizada com absorvância de 560nm.

#### 4.6.2 Proteínas solúveis

Para determinação de proteínas solúveis foi utilizado o teste de Bradford. Estabelecida a curva com albumina e NaCl, foram utilizados 4,5mL de solução de Bradford, 450µL de NaCl e 50µL de amostra. A amostra utilizada é o mesmo material utilizado para extração de SOD. A leitura foi obtida com absorbância de 595nm.

#### 4.6.3 Peroxidase

Para medir atividade de peroxidase foram utilizados 5mg de semente maceradas com nitrogênio líquido, adicionado de 1,5mL de tampão fosfato de sódio 0,01M e pH 6,0, centrifugado a 11.000rpm/25min. A leitura foi realizada com 50µL de sobrenadante e 1,45mL de tampão leitura, este último acrescido de 0,25% (v/v) de guaiacol e 306µL de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 0,1M. Leitura realizada aos 10 min de reação em espectrofotometria a 470nm.

#### 4.6.4 Malondialdeído

Para quantificar a produção de malondialdeído foram utilizados 5mg de sementes maceradas com nitrogênio e 3,5mL de etanol 80%. Centrifugado a um minuto para retirar sobrenadante. Para a leitura foi utilizado 0,75µL de ácido tiobarbitúrico com 0,65% em ácido tricloroacético a 20% (p/v), incubado a 95°C/20min. Transferido para banho de gelo, centrifugado e leitura em espectrofotômetro a 532nm e 600nm.

Os dados foram ajustados pela equação:

$$\left[ \left( \frac{A_{532} - A_{600}}{155.000} \right) \right] \times 10^{16}$$

Os resultados foram expressos em nmol de MDA por grama de massa fresca.

#### 4.7 Expressão de resultados

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

O índice de velocidade de germinação (GVI) para cada lote de sementes testadas foi calculado como uma modificação de Maguire (1962), da

seguinte forma: 
$$GVI = \frac{G1}{N1} + \frac{G2}{N2} + \dots + \frac{Gn}{Nn}$$
, onde G1, G2 e Gn são as sementes germinadas em cada período de avaliação até n, que é o tempo de contagem passado. N é o número de dias após cada período de contagem (7, 14, 21 até germinação constante).

#### 4.8 Análise estatística

A porcentagem de germinação e de viabilidade foram transformadas em arco seno da raiz quadrada  $\times 100^{-1}$  para normalizar a variação. Os dados foram expressos como valores médios  $\pm$  desvios-padrão (Figuras 3 a 14). O delineamento experimental foi o inteiramente ao acaso com três repetições e arranjo fatorial de 9 x 3 (combinação de graus de umidade da semente em cada equilíbrio higroscópico e ambientes de armazenamento x períodos de avaliação) para cada espécie. Os tratamentos qualitativos e quantitativos foram comparados pelo teste Tukey à 5% de probabilidade. Os tratamentos quantitativos, por serem três, não possibilitaram o estudo por regressão polinomial. Todas as análises foram feitas utilizando-se o software SISVAR<sup>®</sup> (FERREIRA, 2008).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Análises de germinação, IVG e teste de tetrazólio

Sementes armazenadas com teores de umidade muito baixos tendem a suportar mais os períodos de armazenamento, mas além da umidade das sementes é necessário observar a temperatura do armazenamento. Sementes de orquídeas foram submetidas a armazenamentos em três ambientes com temperaturas diferentes (5°C, -18°C e -196°C) estocadas com três níveis de umidade diferentes na semente (super seca com 1,5%, seca 6,4% e úmida 12%).

Na tabela 3 podemos observar que amostras de *Cattleya purpurata* não apresentaram germinação na fase inicial dos experimentos, com sementes frescas recém-colhidas, sem expressão de resultados para este teste; a viabilidade avaliada pelo teste de tetrazólio, ficou em torno de 80%, sugerindo uma provável dormência durante os estudos, pois a viabilidade se apresentou alta.

Sementes de *Cattleya tigrina* apresentaram 75% de germinação e correspondência na viabilidade, mantendo níveis de 88% apresentados pelo teste de tetrazólio.

Em *Cattleya amethystoglossa* a capacidade de germinação inicial foi baixa, em torno de 13%, com viabilidade de 88%; alguns mecanismos não conhecidos podem ter afetado o desempenho da germinação, como, por exemplo, dormência de sementes, demora estratégica para retomada de atividades fisiológicas e metabólicas.

Para *Cattleya brevicaulis* os índices de germinação e viabilidade se apresentaram elevados, acima de 90% para todas as análises.

**Tabela 3-** Resultados de germinação (G), índice de velocidade de germinação (IVG) e teste de tetrazólio (TZ) obtidos nas análises preliminares nas sementes de *Cattleya purpurata*, *Cattleya tigrina*, *Cattleya amethystoglossa* e *Cattleya brevicaulis*.

Amostras	Germ (%) $\pm$ DP*	IVG $\pm$ DP	TZ (%) $\pm$ DP
<i>Cattleya purpurata</i>	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	81 $\pm$ 2,20
<i>Cattleya tigrina</i>	75 $\pm$ 5,54	8,22 $\pm$ 0,24	88 $\pm$ 2,36
<i>Cattleya amethystoglossa</i>	13 $\pm$ 9,41	1,45 $\pm$ 0,93	88 $\pm$ 2,21
<i>Cattleya brevicaulis</i>	97 $\pm$ 5,47	13,19 $\pm$ 0,53	92 $\pm$ 0,36

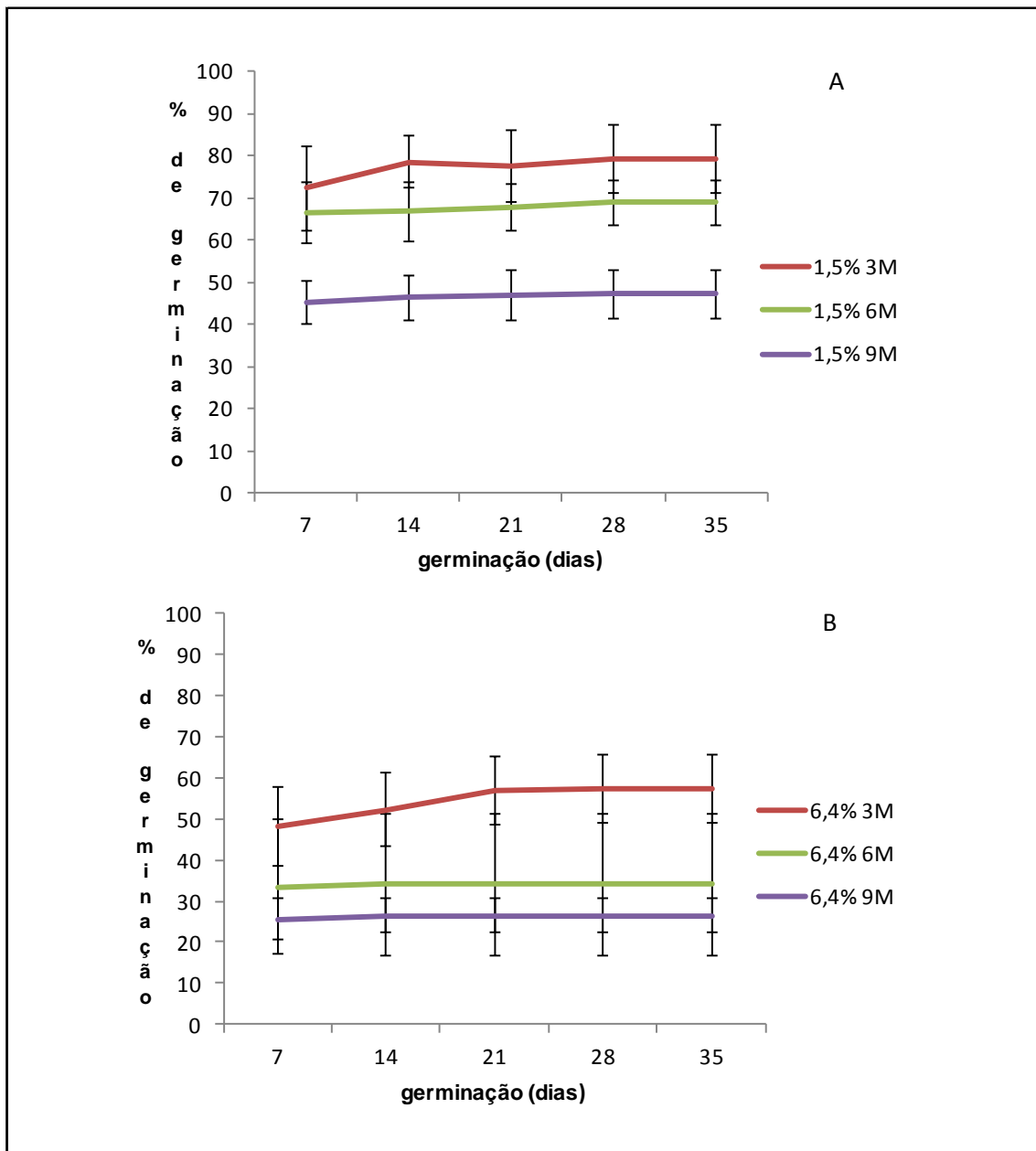
\* DP desvio padrão da média amostral

*Cattleya purpurata* ao longo de três meses após armazenamento com 1,5% de teor de água foi possível observar acima de 75% de germinação; com seis meses esses resultados diminuíram para em torno de 67% e com nove meses de armazenamento não ultrapassou limites de 50% (Figura 3A).

As mesmas sementes, armazenadas com 6,4% de umidade, apresentaram germinação com pouco mais de 55% ao final de três meses, com seis meses este índice caiu para pouco mais de 30% e no final do experimento, com nove meses, atingiu cerca de 25% (Figura 3B).

Sementes armazenadas com alto teor de água em determinados ambientes podem sofrer injúrias muito intensas e não sobreviver ao armazenamento, assim, para as sementes mantidas em condições de 12%, não houve resultados para germinação em nenhum período do experimento não sendo necessários gráficos para estes resultados.

**Figura 3-** Porcentagem de germinação de *Cattleya purpurata* armazenadas a 5°C com diferentes umidades de sementes, A (1,5%) e B (6,4%).



Sementes armazenadas de *Cattleya purpurata* com teores de umidade referentes a 1,5% em condições de freezer (-18°C) apresentam germinação de mais de 75% nos primeiros meses; aos seis meses a taxa de germinação diminuiu para em torno dos 44% e com nove meses manteve valores de 50% de germinação (Figura 4A).

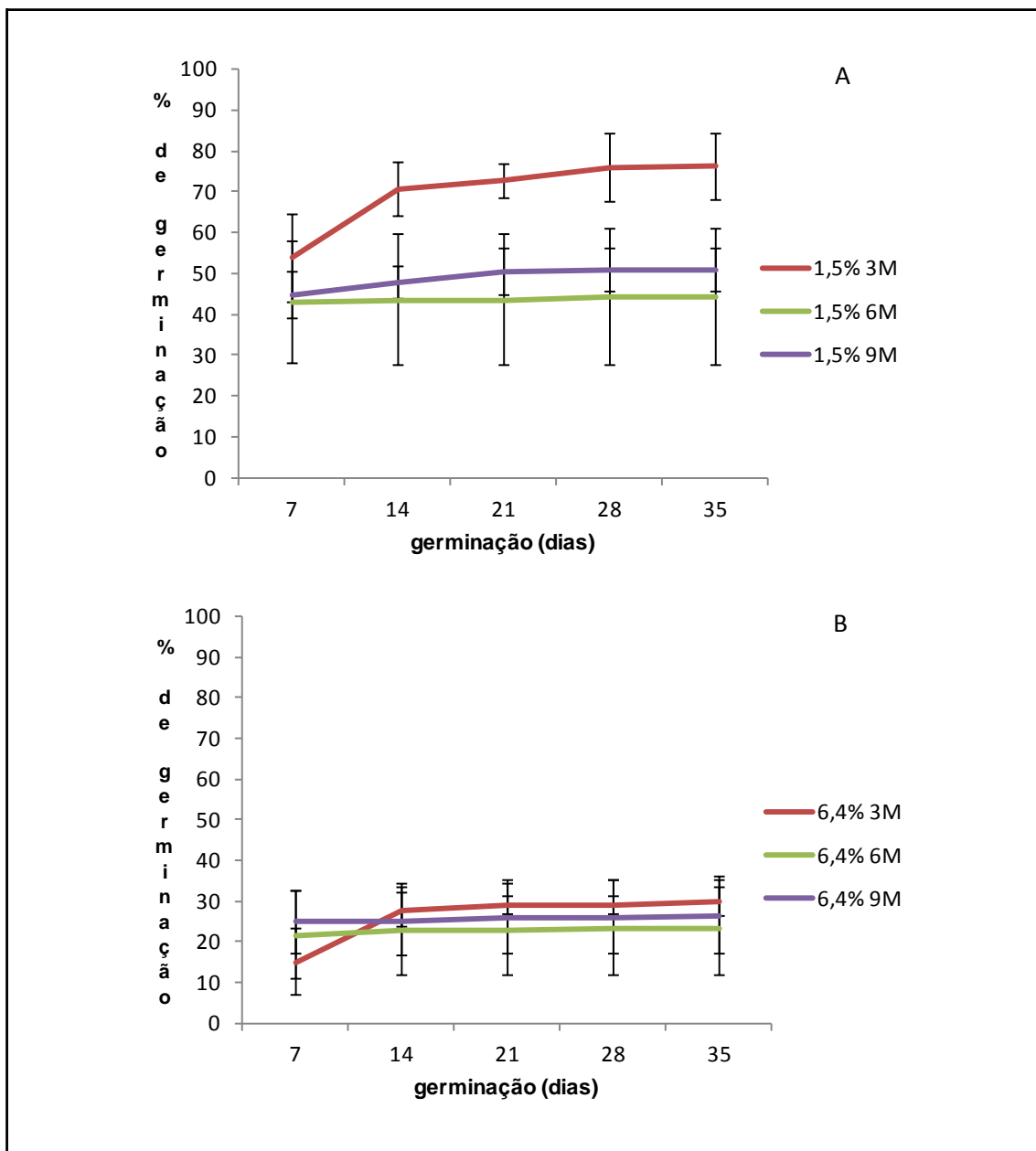
Na figura 4B amostras pouco mais úmidas, com teores de 6,4%, não apresentaram valores de germinação acima de 30% nos primeiros meses, com seis



meses houve uma queda de menos de 25% e manteve-se com pouco mais de 25% aos nove meses.

Sementes com 12% não apresentaram resultados para germinação quando armazenadas em condições abaixo de zero.

**Figura 4-** Porcentagem de germinação de *Cattleya purpurata* armazenadas a  $-18^{\circ}\text{C}$  com diferentes umidades de sementes, A (1,5%) e B (6,4%).

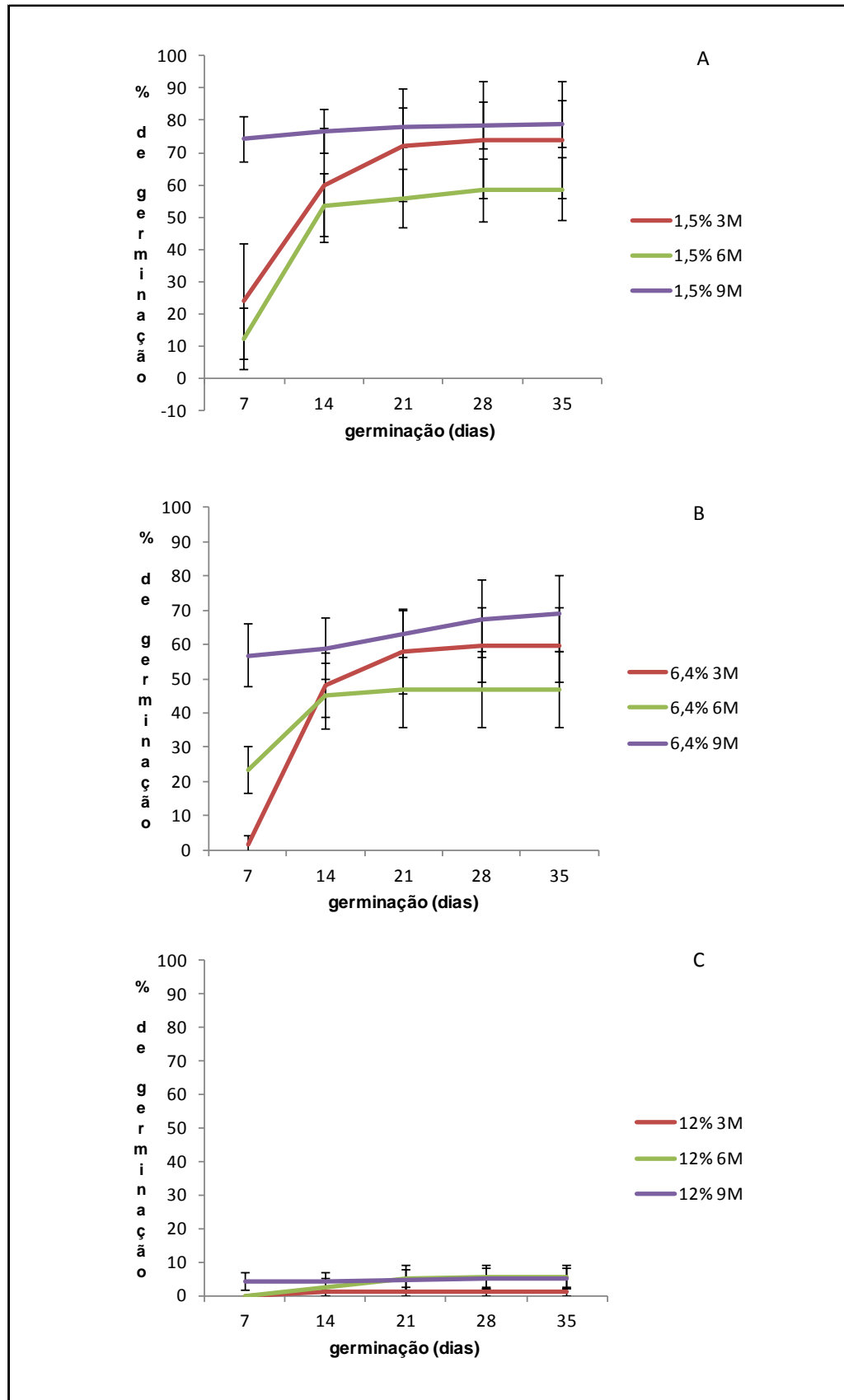


Para bancos de germoplasma são indicadas temperaturas sub-zero, como por exemplo, nitrogênio líquido (-196°C) para o congelamento rápido sem danificar membranas com formações de cristais de gelo. Sementes de *C. purpurata* armazenadas nessas condições com 1,5% apresentaram resultados de germinação acima de 70% nos primeiros três meses de armazenamento, com seis meses houve um decréscimo para 58% e com nove meses, o período mais longo testado, apresentou mais de 78% de germinação (Figura 5A).

Sementes com perfil de umidade em torno de 6,4% demonstraram germinação de quase 60% no primeiro período de armazenamento, num segundo momento, entre seis e nove meses de armazenamento a germinação ficou entre 50 e 70% (Figura 5B).

Para poder manter uma semente viável durante um longo período é preciso que os teores de água sejam mínimos, altos teores de umidade pode acarretar em danos nas membranas ou mesmo morte das sementes dependendo do local do armazenamento, podendo surgir fungos ou degradar a membrana em temperaturas abaixo de zero. Em sementes armazenadas com 12%, um teor considerado muito alto, as sementes de *C. purpurata* não atingiram níveis de germinação acima de 5% ao longo de todo o período de armazenamento, verificando que os níveis elevados de umidade podem influenciar na viabilidade das sementes (Figura 5C).

**Figura 5-** Porcentagem de germinação de *Cattleya purpurata* armazenadas a  $-196^{\circ}\text{C}$  com diferentes umidades de sementes, A (1,5%), B (6,4%) e C (12%).

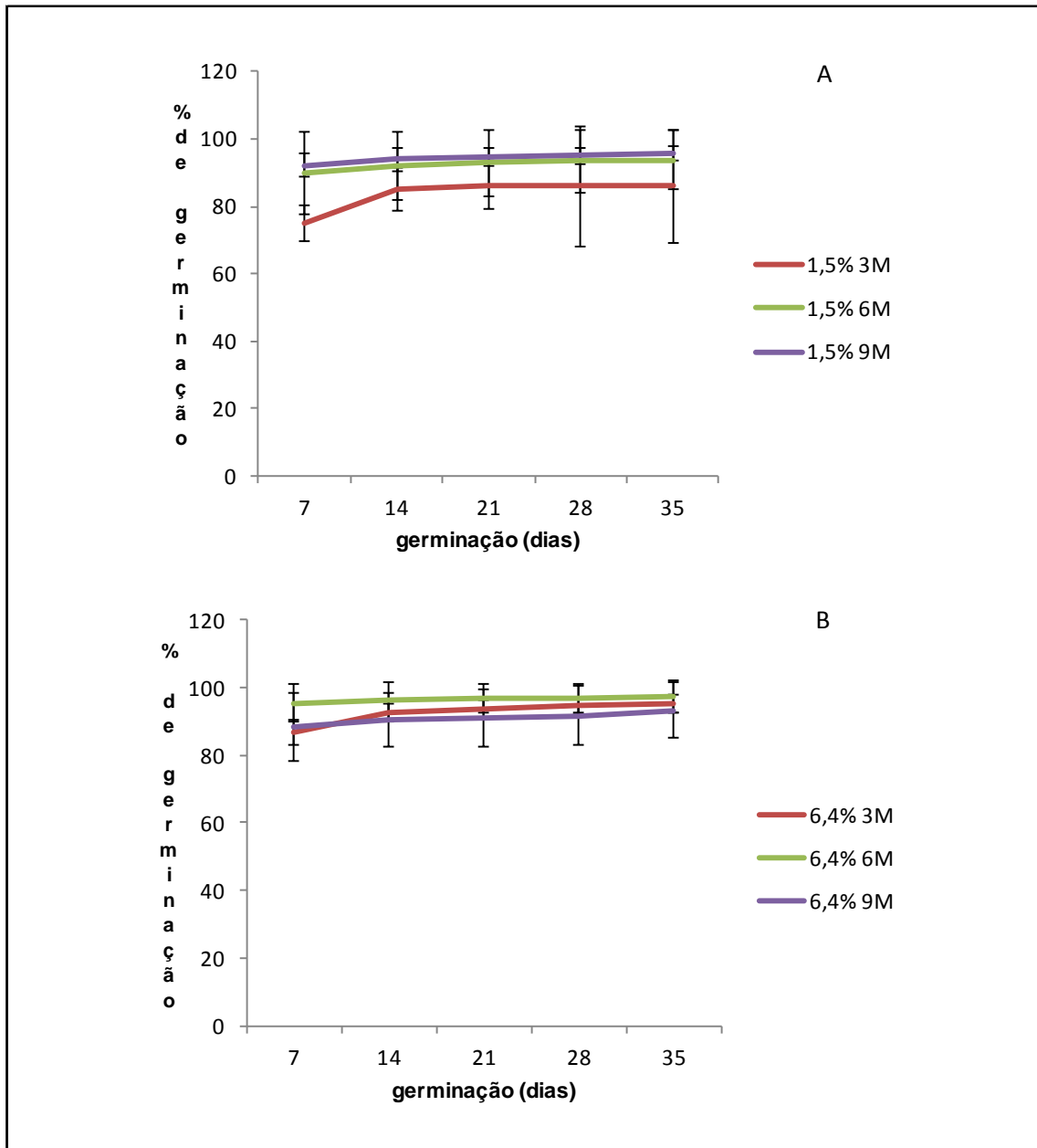


Em *Cattleya tigrina* sementes armazenadas por três meses em condições de 5°C e umidade relativa de 1,5% para a semente, um estado super seco, apresentou melhor desenvolvimento a partir da segunda semana, mantendo o nível de germinação por volta de 85%. Aos seis meses os índices de germinação atingiram mais de 90% e com nove meses ultrapassou os limites de 95% de germinação (Figura 6A).

Amostras mantidas em armazenamento com um grau de umidade em torno de 6,4% apresentaram índices com mais de 95% de germinação para os meses iniciais do experimento, ao final dos nove meses apresentou pequeno decréscimo para 93% (Figura 6B).

Sementes com teores de umidade com aproximadamente 12% não apresentaram resultados para germinação durante nenhuma fase do desenvolvimento do experimento.

**Figura 6-** Porcentagem de germinação de *Cattleya tigrina* armazenadas a 5°C com diferentes umidades de sementes, A (1,5%) e B (6,4%).

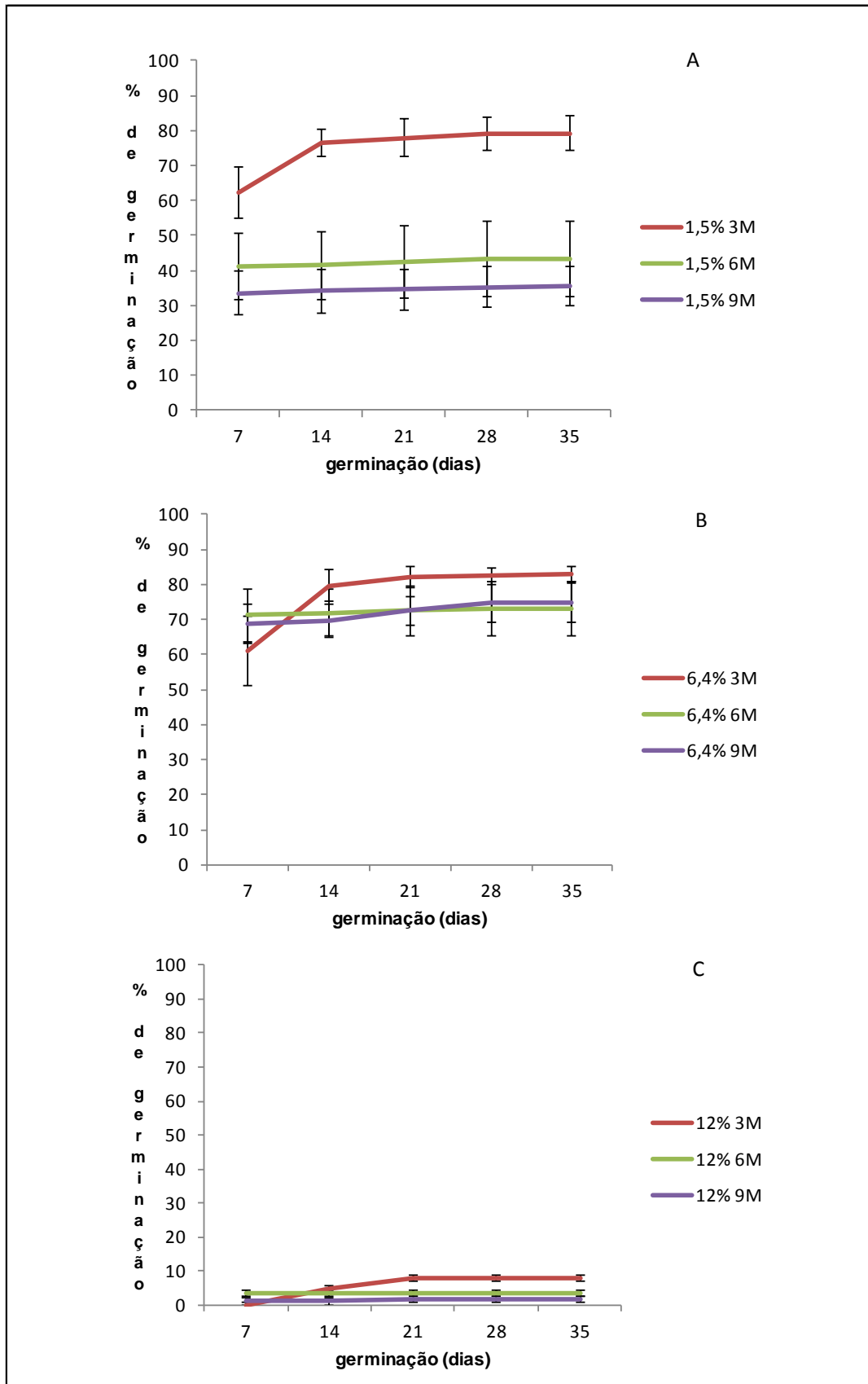


Após armazenamento por três meses em condições abaixo de zero, como  $-18^{\circ}\text{C}$ , e umidade super seca com 1,5%, pode-se observar que as sementes apresentam uma germinação inicial lenta, mas a partir dos 14 dias apresentam níveis de aproximadamente 80% de germinação. Após seis meses este índice não ultrapassa os 43%, com nove meses essas sementes atingem no máximo 35% de capacidade de germinar (Figura 7A).

Para as sementes de *C. tigrina* armazenadas com 6,4% do teor de água os resultados para germinação ultrapassaram 80% nos três primeiros meses. Com o decorrer do período de avaliação não atingiu mais do que 75% dos índices germinativos ao final dos nove meses (Figura 7B).

Para amostras muito úmidas de sementes, com 12%, os índices de germinação não ultrapassaram 10% dos resultados, obtendo melhores resultados nos três primeiros meses, após esse período não ultrapassou 5% de capacidade de germinar (Figura 7C).

**Figura 7-** Porcentagem de germinação de *Cattleya tigrina* armazenadas a  $-18^{\circ}\text{C}$  com diferentes umidades de sementes, A (1,5%), B (6,4%) e C (12%).



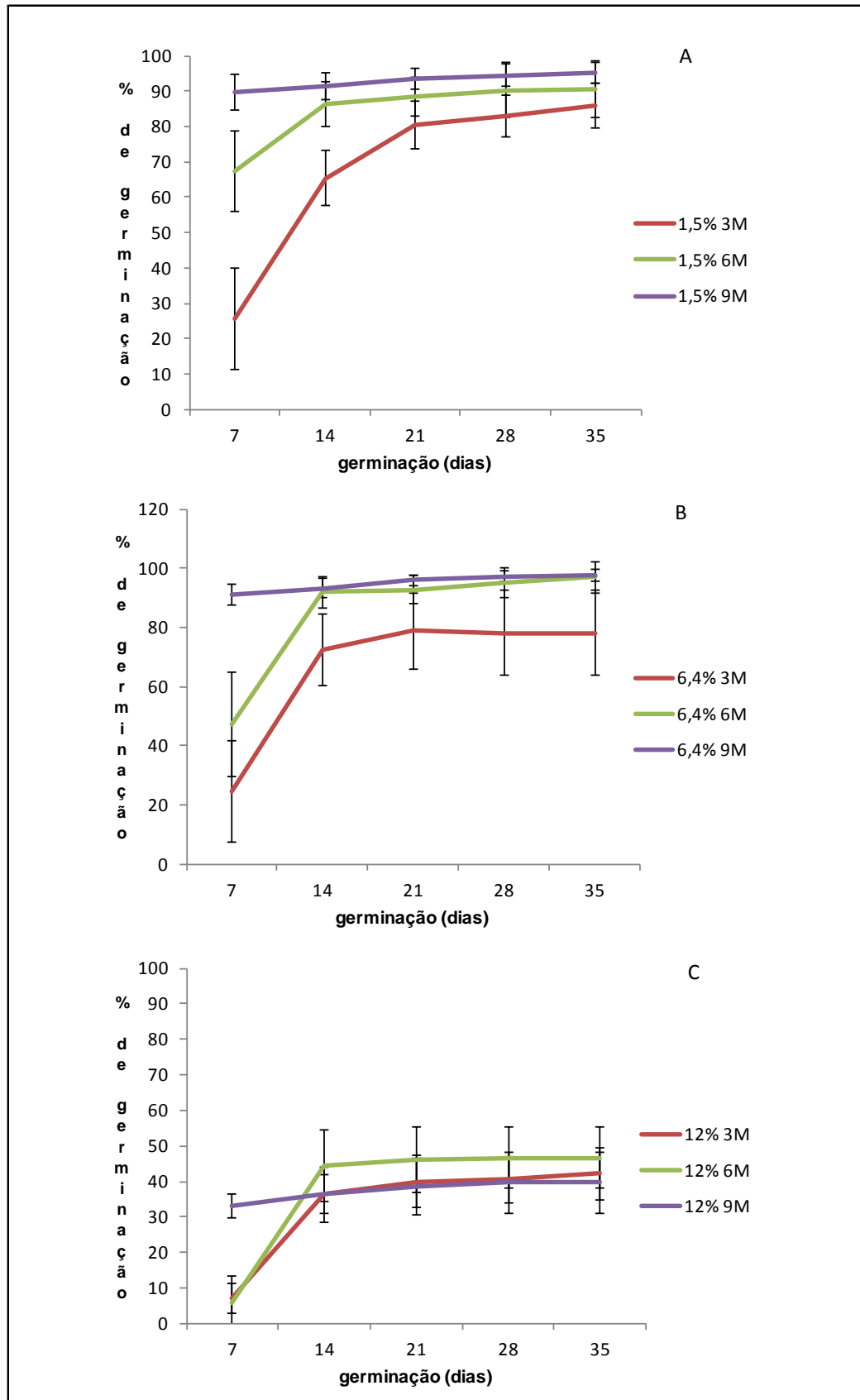
Amostras de sementes mantidas em nitrogênio líquido com 1,5% apresentaram níveis de germinações acima de 80% durante o experimento. Sementes com três meses de estocagem apresentaram uma germinação lenta, atingindo o ponto máximo após 28 dias, expressando 85% da germinação. Com seis meses a germinação atingiu níveis de 90% de germinação, tendo uma resposta mais rápida na fase inicial e a partir do 14º dia obteve germinação máxima. Ao final dos nove meses sementes super secas de *C. tigrina* atingiram 95% do estado de germinação, o maior índice em relação aos ambientes anteriores estudados (Figura 8A).

Sementes com teores em torno de 6,4% de umidade apresentam germinações acima de 90% ao final de nove meses. A primeira fase de germinação ocorreu mais lentamente, porém atingiram níveis de 78% de germinação, após seis meses a retomada da atividade germinativa foi mais rápida, obtendo quase a totalidade de germinação a partir da segunda semana, os dados apresentam resultados acima de 95% para seis e nove meses (Figura 8B).

Em sementes com alto teor de água os níveis de germinação após o armazenamento sub-zero não atingiram 50%. A tomada da germinação nos seis meses iniciais se apresentou mais lenta, atingindo 45% da germinação nos dois períodos. Com nove meses de armazenamento a capacidade de germinar das sementes caiu para menos de 40% (Figura 8C).



**Figura 8-** Porcentagem de germinação de *Cattleya tigrina* armazenadas a  $-196^{\circ}\text{C}$  com diferentes umidades de sementes, A (1,5%), B (6,4%) e C (12%).

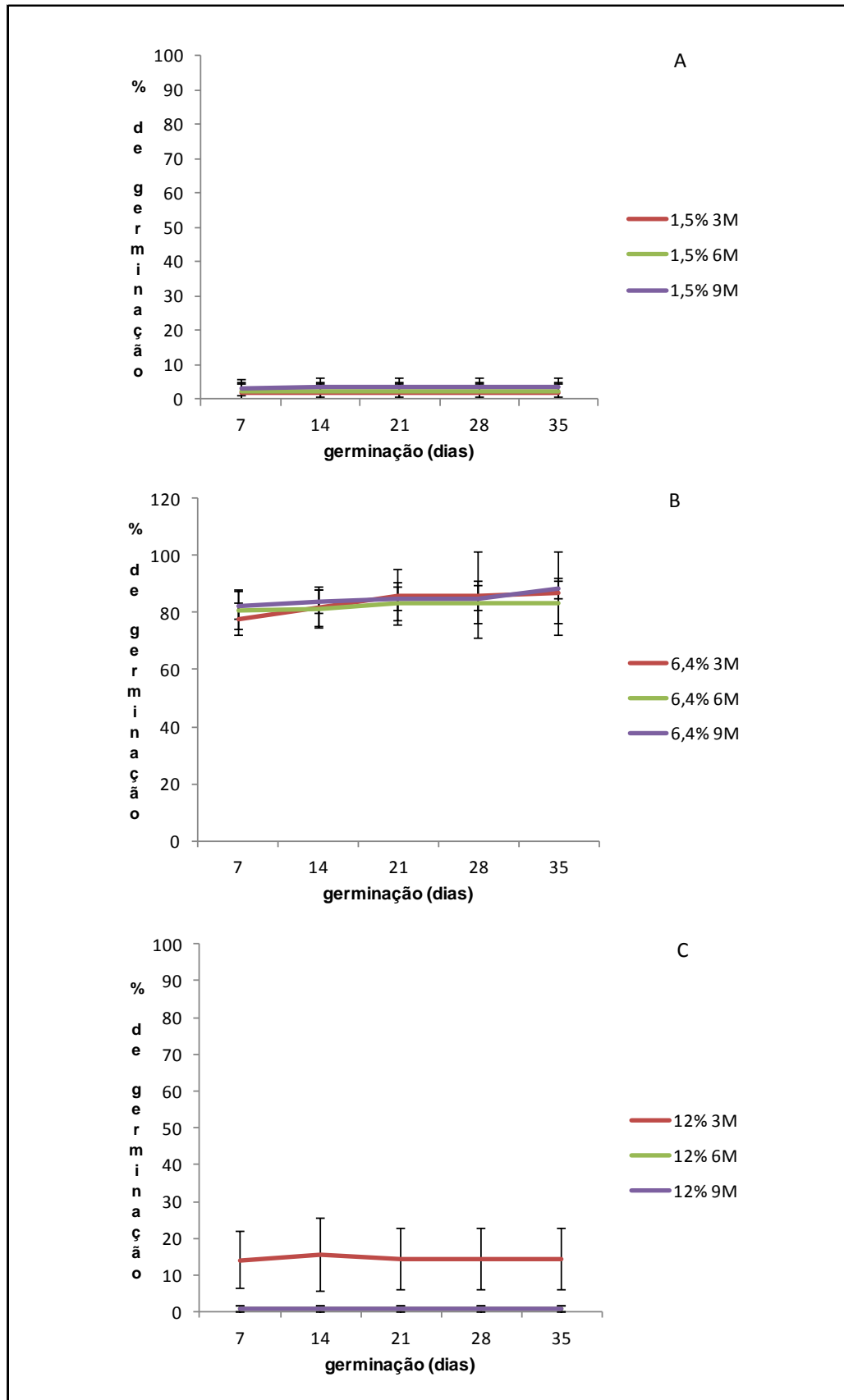


*Cattleya amethystoglossa*, após o período de nove meses de armazenamento com 1,5% de teor de água, sementes mantidas em condição de 5°C não apresentaram resultados acima de 3% de germinação (Figura 9A).

Em sementes com níveis considerados adequados de umidade, em torno de 6,4%, a germinação atingiu níveis maiores que 80% para os nove meses do armazenamento, mantendo um crescimento gradual de 83 a 88%, de três a nove meses, respectivamente (Figura 9B).

O alto teor de umidade das sementes influencia na hora da germinação e no período de armazenamento. Sementes de *C. amethystoglossa* armazenadas a 5°C com 12% esboçaram resultados quase zero. Nos três meses iniciais a germinação atingiu cerca de 15%, após os seis não ultrapassaram 2% (Figura 9C).

**Figura 9-** Porcentagem de germinação de *Cattleya amethystoglossa* armazenadas a 5°C com diferentes umidades de sementes, A (1,5%), B (6,4%) e C (12%).

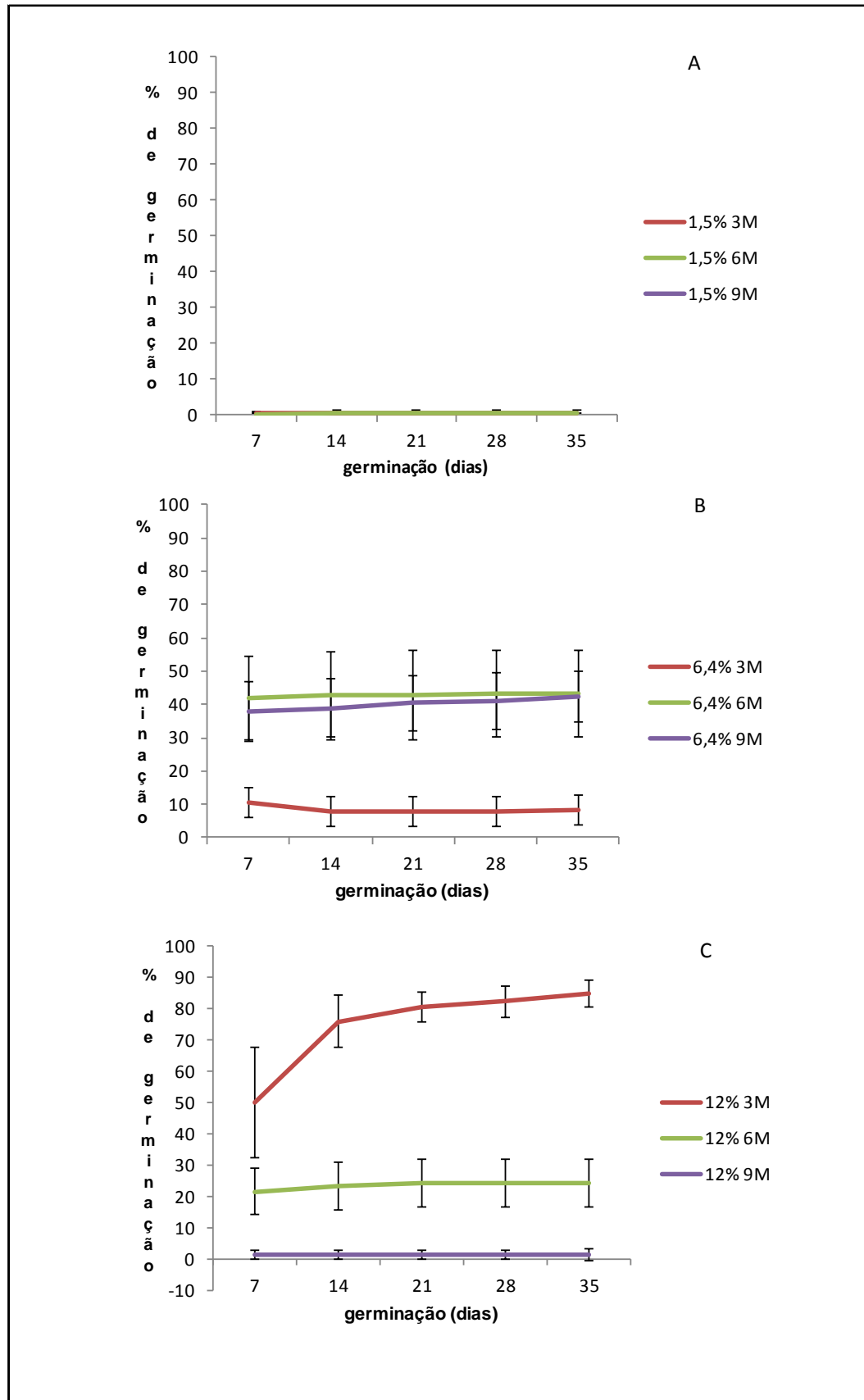


Para todos os períodos de armazenamento a  $-18^{\circ}\text{C}$ , sementes super secas (1,5%) não ultrapassaram 1% de germinação, mantendo os mesmos níveis germinativos para os três períodos avaliados (Figura 10A).

Sementes com 6,4% apresentaram resultados em torno de 10% de germinação no primeiro período de avaliação, após seis meses os níveis atingiram mais de 40%, com um leve declínio aos nove meses, mas permanecendo nos níveis de 40% de germinação (Figura 10B).

Os índices de germinação para sementes armazenadas com 12% foram acima de 80% no primeiro período de germinação, com seis meses o máximo atingido não ultrapassou 25% e ao final dos nove meses a germinação não atingiu 2% dos índices (Figura 10C).

**Figura 10-** Porcentagem de germinação de *Cattleya amethystoglossa* armazenadas a  $-18^{\circ}\text{C}$  com diferentes umidades de sementes, A (1,5%), B (6,4%) e C (12%).

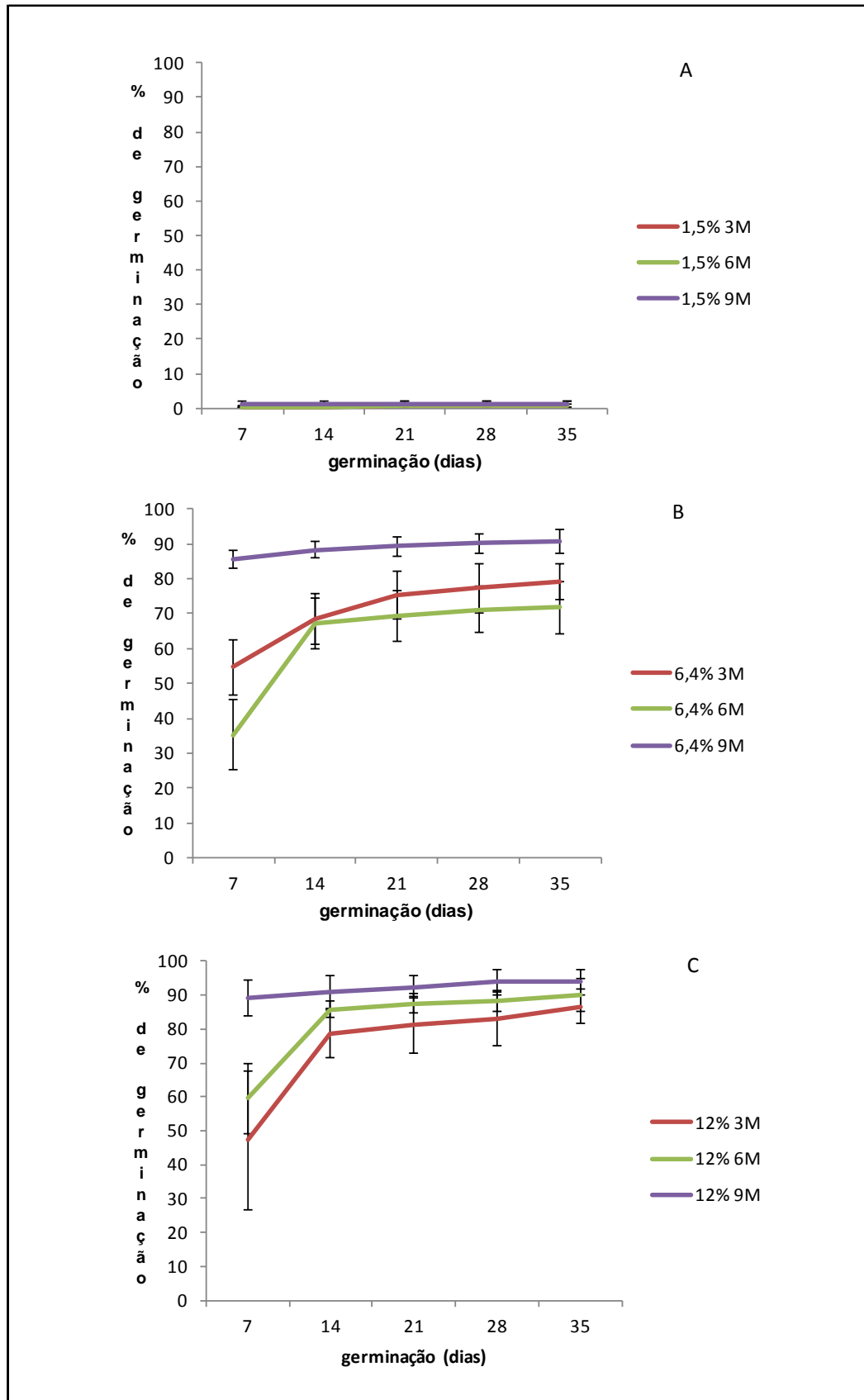


Amostras de sementes super secas não suportaram o armazenamento em condições de  $-196^{\circ}\text{C}$  e umidade de 1,5%, ao final do experimento, no decorrer de nove meses foi possível verificar que a germinação não atingiu mais do que 2% dos índices (Figura 11A).

Sementes mantidas em armazenamento com 6,4% e condições de nitrogênio líquido apresentaram resultados próximos a 80% de germinação no primeiro trimestre, mantendo um aumento crescente durante o período de avaliação. Com seis meses de armazenamento as sementes germinadas atingiram níveis de 70%, atingindo quase totalidade com 21 dias de instalação. Ao final de nove meses apresentou resultados de 90% de germinação ao final da avaliação, mantendo um resultado crescente de conservação da espécie com um prolongamento constante na capacidade de armazenamento (Figura 11B).

Amostras de *C. amethystoglossa* mantiveram níveis de germinação elevados mesmo em sementes super úmidas, com 12%, os níveis se mantiveram em aproximadamente 85%, 90% e 95% de germinação nas avaliações de três, seis e nove meses, respectivamente (Figura 11C).

**Figura 11-** Porcentagem de germinação de *Cattleya amethystoglossa* armazenadas a  $-196^{\circ}\text{C}$  com diferentes umidades de sementes, A (1,5%), B (6,4%) e C (12%).



Sementes de *Cattleya brevicaulis* armazenadas a 5°C em umidade de 1,5% atingiam valores maiores que 90% na germinação nos três primeiros meses, com um desenvolvimento mais lento na primeira semana, mas mantendo os níveis elevados até o final da avaliação.

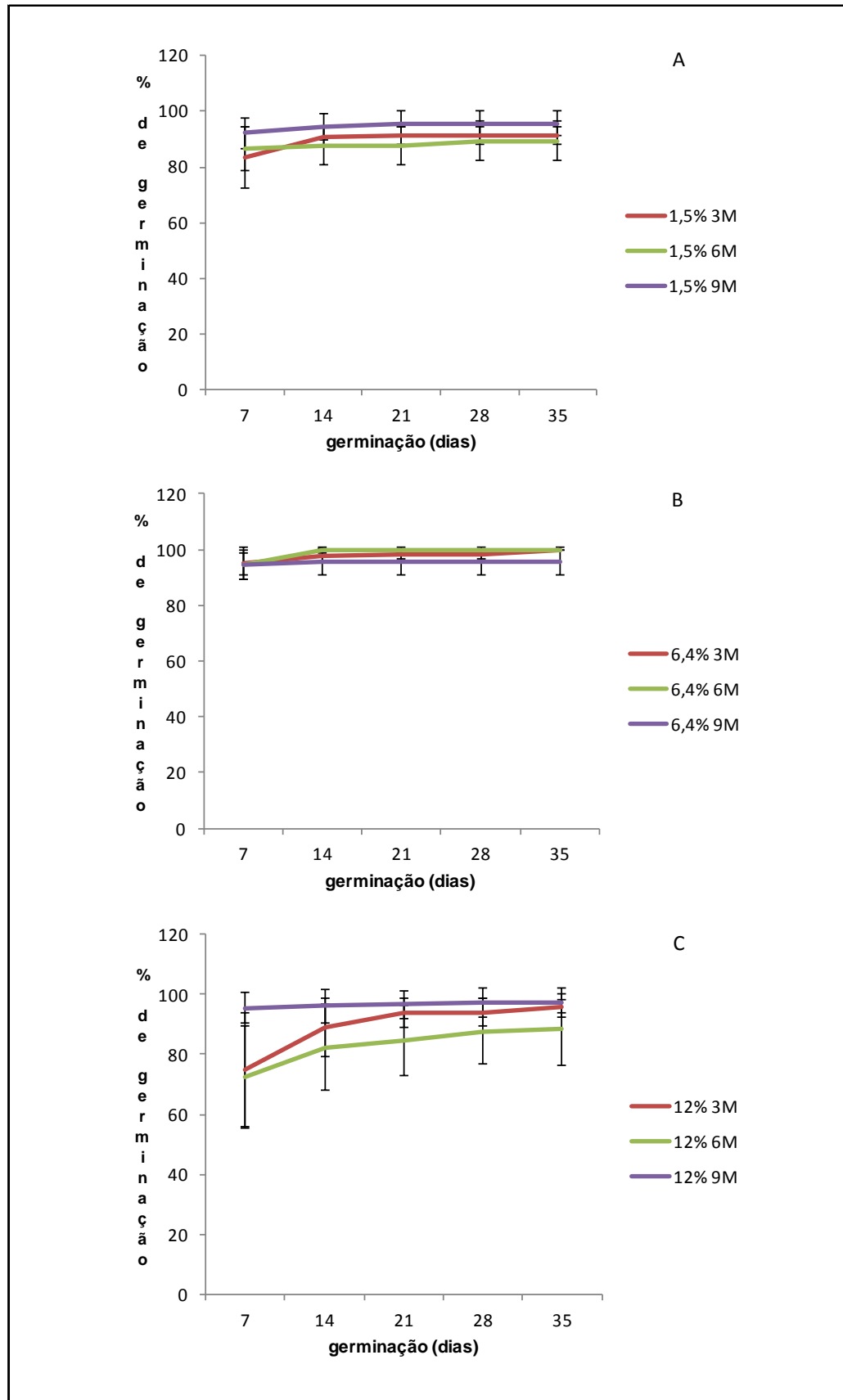
Aos seis meses houve um crescimento na primeira semana, dando uma estabilizada, a partir da terceira semana os índices atingiram quase 90% de germinação. Aos nove meses a retomada da semente para iniciar a germinação foi mais lenta, mas atingiu os níveis de 90% da germinação após 21 dias de instalação (Figura 12A).

A germinação de 6,4% atingiu níveis de 100% nos primeiros meses. O primeiro trimestre apresentou crescimento lentamente, atingindo a totalidade somente no final dos 35 dias de avaliação. Aos seis meses a germinação foi total a partir dos 14 dias apresentando 100% dos índices. Ao final do experimento as sementes mantiveram capacidade de germinação acima de 95% com nove meses de armazenamento (Figura 12B).

Sementes úmidas de *C. brevicaulis* obtiveram bons resultados ao final do experimento. Todos os níveis de germinação para as avaliações se mantiveram acima de 90%, atingindo quase a totalidade a partir da segunda semana de instalação do experimento (Figura 12C).



**Figura 12-** Porcentagem de germinação de *Cattleya brevicaulis* armazenadas a 5°C com diferentes umidades de sementes, A (1,5%), B (6,4%) e C (12%).

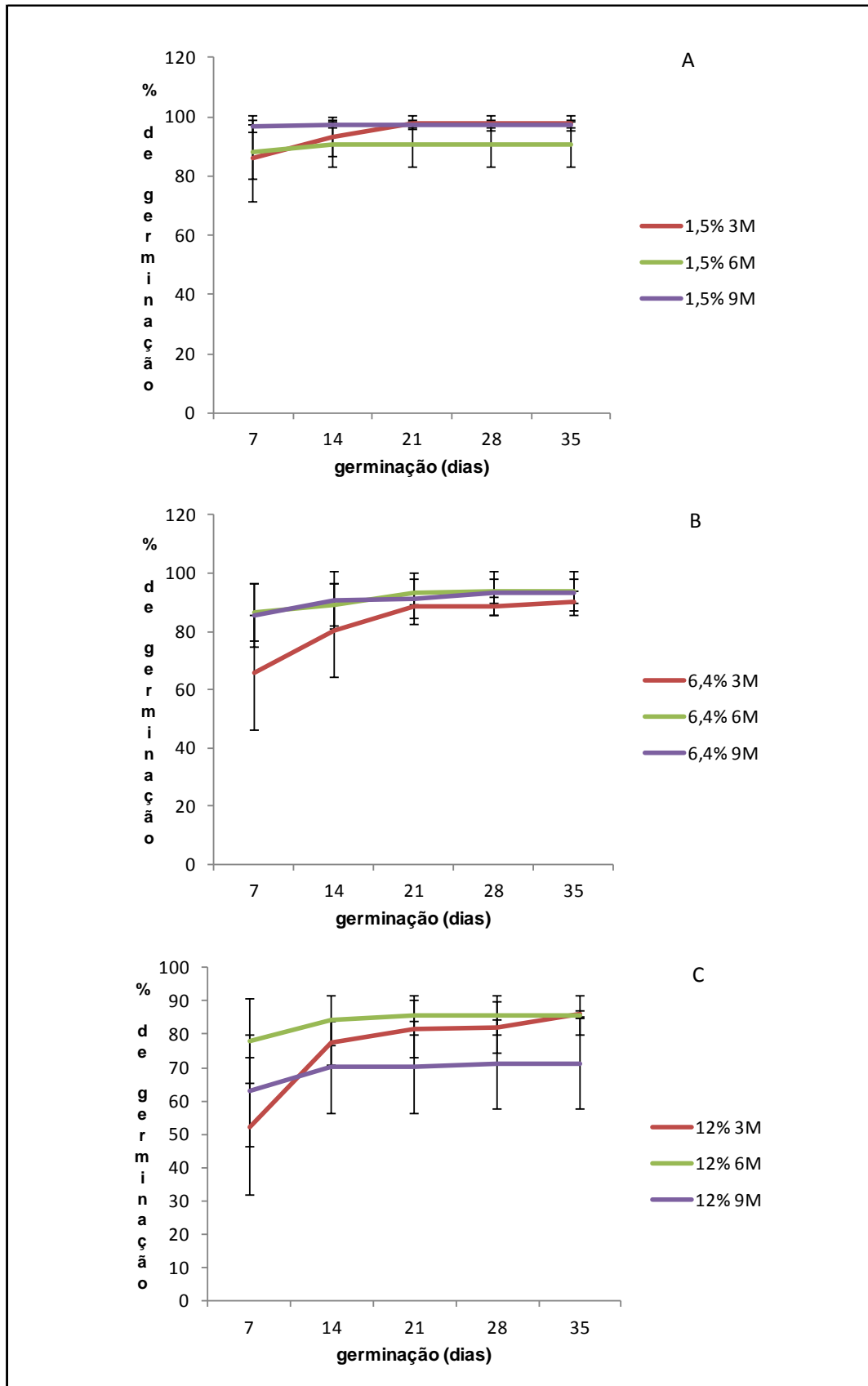


Armazenadas em  $-18^{\circ}\text{C}$ , sementes super secas apresentaram mais de 95% de germinação nos três primeiros meses com crescente aumento até os 21 dias, após este período se manteve mais estável até os 35 dias. Aos seis meses a germinação atingiu o nível máximo a partir do 14<sup>o</sup> dia se mantendo constante até final da avaliação acima de 90%. Até o final do período de avaliação, com nove meses, as sementes mantiveram condições de germinação acima de 95% (Figura 13A).

Amostras com 6,4% após três meses de armazenamento teve um crescente avanço aos 21 dias mantendo níveis elevados em torno de 90%. Para as amostras avaliadas com seis e nove meses a germinação prevaleceu acima de 90%, com tomada das atividades a partir dos 14 dias mantendo-se constante até o final da avaliação (Figura 13B).

Para o armazenamento de amostras super úmidas, com 12%, a germinação do período de três meses apresentou alto avanço nos primeiros sete dias, mantendo-se estável próximo de 80% com um moderado aumento de 85% na última semana (28-25 dias). Com seis meses de estudos foi possível verificar germinações na faixa de 80%. Já aos nove meses houve um declínio, mas os níveis superaram 70% de germinação (Figura 13C).

**Figura 13-** Porcentagem de germinação de *Cattleya brevicaulis* armazenadas a -18°C com diferentes umidades de sementes, A (1,5%), B (6,4%) e C (12%).

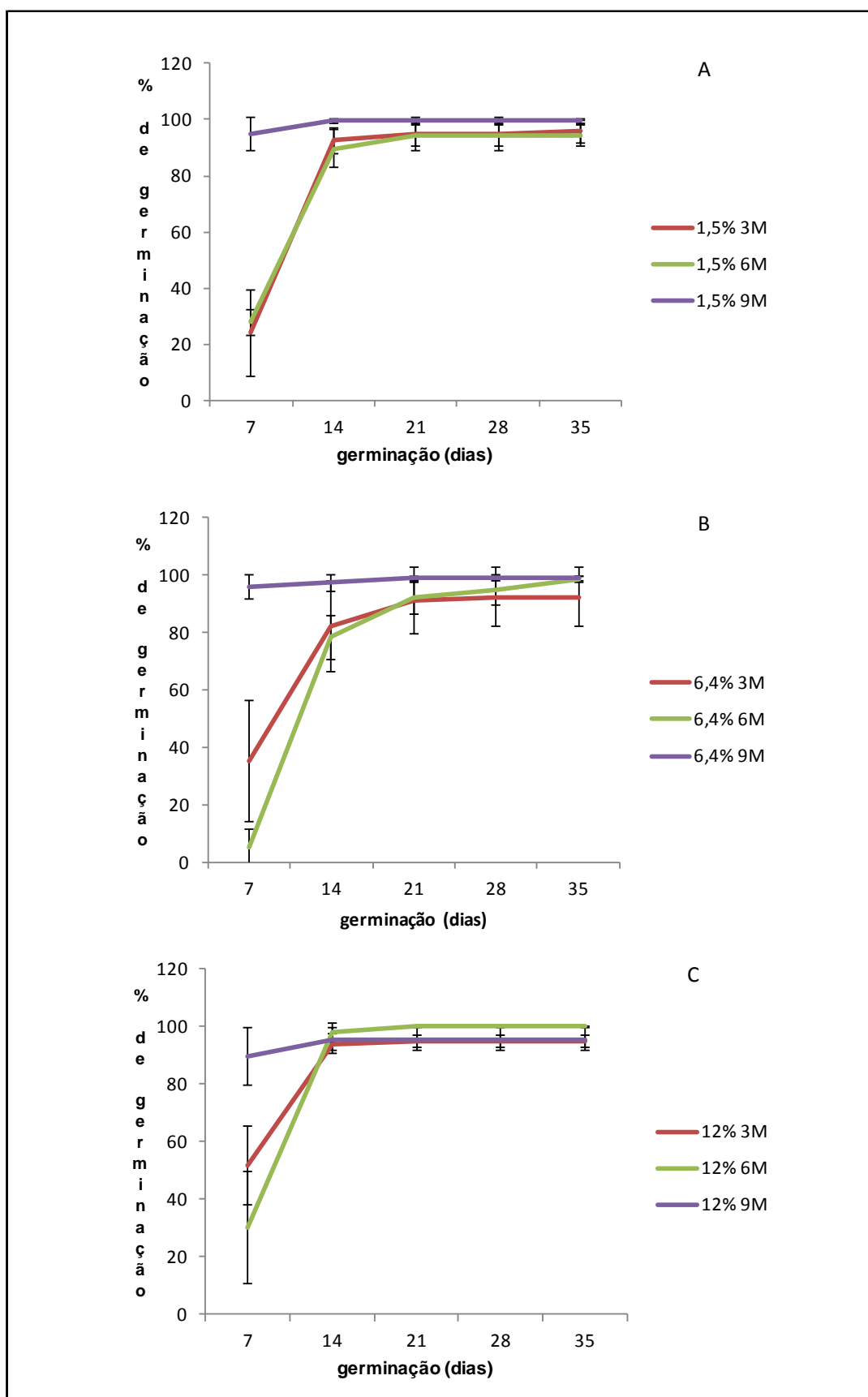


Nos primeiros seis meses de avaliação o comportamento da germinação foi semelhante para amostras de *C. brevicaulis* armazenadas em nitrogênio líquido e com umidade de 1,5%. Com sete dias as atividades se mostraram bem lentas, mas entre 7-14 dias atingiu um pico de mais de 95% de germinação. Para sementes armazenadas por mais tempo (nove meses) houve uma retomada das atividades de germinação mais rápida mantendo níveis de aproximadamente 100% de germinação (Figura 14A).

Em sementes com níveis de umidade mais recomendados, com 6,4%, sementes armazenadas há três meses apresentam crescimento mais compassado, obtendo estabilidade a partir dos 21 dias de avaliação com 90% de germinação. Com seis meses houve um crescente avanço de 7-14 dias e após os 21 dias alcançou níveis de 98% de germinação. Ao final de nove meses a germinação de sementes se iniciou com 95% dos índices, se mantendo estável próximo dos limites de 100% (Figura 14B).

Sementes úmidas de *C. brevicaulis* apresentam crescimento lento até o 14º dia de germinação no primeiro semestre de avaliação, após esse período prevaleceu valores de 100% de germinação. Por estar com níveis de umidade elevados para os indicados para sementes poderem ser armazenadas adequadamente, esta espécie apresentou bons resultados em relação a todas as temperaturas avaliadas, perdendo viabilidade no final dos nove meses, mas não ultrapassando a faixa de 95% de germinação (Figura 14C).

**Figura 14-** Porcentagem de germinação de *Cattleya brevicaulis* armazenadas a -196°C com diferentes umidades de sementes, A (1,5%), B (6,4%) e C (12%).



Nas análises estatísticas podem-se observar, na tabela 4, que foram relacionados resultados de tratamentos (Trat – A, representados pela combinação de ambientes de armazenamento e teores de água nas sementes), períodos de avaliação (Per - B) e a interação desses dois últimos (A x B). Em *Cattleya purpurata* é possível verificar que houve interação significativa entre os tratamentos e períodos de avaliação para germinação, IVG e tetrazólio, isto indica os resultados devem ser explorados considerando o desdobramento da interação (Tabela 5).

Em *Cattleya tigrina* os valores de germinação apresentaram dados não significativos para os períodos de avaliação, mas a interação foi significativa. Os demais dados avaliados apresentaram interação significativa, apresentando baixos coeficientes de variações para germinação e tetrazólio. Deste modo os resultados foram analisados considerando o desdobramento da interação (Tabela 6).

Para *Cattleya amethystoglossa* todas as análises apresentaram resultados significativos para cada tratamento, período e interação tratamento x período, com baixos coeficientes de variação. Assim a análise foi apresentada segundo o desdobramento da interação (Tabela 7).

Em *Cattleya brevicaulis* dados de germinação não variaram significativamente nos períodos e interação entre tratamentos x períodos, então os resultados significativos obtidos para os tratamentos foram comparados pela média dos três períodos de avaliação (Tabela 8). As demais variáveis apresentaram significância para tratamentos, períodos e para a interação, tornando necessária a apresentação do desdobramento da interação (Tabela 8). Os dados de coeficiente de variação se apresentaram baixos, indicando comportamento semelhante entre as amostras.

**Tabela 4-** Valores de F obtidos na análise da variância dos resultados de germinação (G, %), índice de velocidade de germinação (IVG) e teste de tetrazólio (TZ, %) de sementes condicionadas com 1,5, 6,4 e 12% de teores de água e armazenadas nas temperaturas de 5, -18 e -196°C e avaliadas aos 3, 6 e 9 meses de armazenamento.

FV	<i>Cattleya purpurata</i>			<i>Cattleya tigrina</i>			<i>Cattleya amethystoglossa</i>			<i>Cattleya brevicaulis</i>		
	G	IVG	TZ	G	IVG	TZ	G	IVG	TZ	G	IVG	TZ
Trat (A)	127,99**	143,90**	516,88**	526,05**	262,93**	670,96**	908,59**	809,59**	271,99**	4,72**	15,11**	4,25**
Per (B)	11,58**	6,89**	14,06**	1,89 <sup>ns</sup>	11,35**	82,99**	11,45**	7,26**	49,07**	0,02 <sup>ns</sup>	30,64**	2,44 <sup>ns</sup>
A x B	5,25**	12,33**	14,18**	11,51**	11,24**	38,51**	53,82**	53,92**	38,77**	1,14 <sup>ns</sup>	6,03**	3,45**
CV	21,40	20,36	7,85	8,18	12,23	3,96	10,40	10,98	5,56	7,74	9,37	2,79

\*\* significativo a 5% de probabilidade; <sup>ns</sup> não significativo; FV fontes de variação; CV coeficiente de variação (%)

Para analisar a germinação de *Cattleya purpurata*, ao longo de nove meses, pode-se observar que houve um declínio de germinação em sementes com 1,5% e 6,4% de teor de água em sementes armazenadas a 5°C. Em -18°C as amostras com 1,5% de teor de água tiveram queda de germinação, com 6,4% se mantiveram estáveis. Em nitrogênio líquido (-196°C) as amostras de 1,5% e 6,4% de água apresentam aumento nos índices de germinação e de índice de velocidade de germinação (IVG) no decorrer de nove meses e foram os tratamentos superiores aos demais com nove meses, indicando serem estas as melhores maneiras de conservação para estas sementes. Com 12% de teor de água não houve resultados para 5°C e -18°C, para nitrogênio líquido apresentou dados de 5% de germinação (Tabela 5).

A viabilidade se apresentou alta para amostras em 5°C com 1,5% e 6,4% de água durante todo o período. Sementes em -18°C e -196°C apresentaram aumento para 1,5% e 6,4%, gradativamente de 60-90% de viabilidade. Exceto sementes com 12% de teor de água que apresentaram valores com menos de 25% de viabilidade para 5°C, 10% para -18°C e 30% para nitrogênio líquido.



**Tabela 5-** Análise do desdobramento da germinação, índice de velocidade de germinação e teste de tetrazólio para a interação entre tratamentos e períodos de armazenamento de sementes de *Cattleya purpurata*.

	Germinação (%)		
	Períodos de armazenamento		
	3 meses	6 meses	9 meses
T5 1,5%	79 a A*	69 a A	47 c B
T5 6,4%	57 b A	34 c B	27 d B
T5 12%	0 d A	0 d A	0 e A
T-18 1,5%	76 ab A	45 bc B	51 bc B
T-18 6,4%	30 c A	28 c A	27 d A
T-18 12%	0 d A	0 d A	0 e A
T-196 1,5%	65 ab AB	59 ab B	79 a A
T-196 6,4%	58 b AB	47 bc B	69 ab A
T-196 12%	0 d A	6 d A	5 e A
	IVG		
	3 meses	6 meses	9 meses
	T5 1,5%	10,77 a A	9,59 a A
T5 6,4%	7,41 bc A	4,82 b B	3,72 c B
T5 12%	0,00 f A	0,00 c A	0,00 d A
T-18 1,5%	9,29 ab A	6,23 b B	6,73 b B
T-18 6,4%	3,13 e A	3,93 b A	3,61 c A
T-18 12%	0,00 f A	0,00 c A	0,00 d A
T-196 1,5%	6,21 cd B	4,87 b B	10,86 a A
T-196 6,4%	4,01 de B	4,97 b B	8,62 ab A
T-196 12%	0,00 f A	0,32 c A	0,62 d A
	Teste de tetrazólio (%)		
	3 meses	6 meses	9 meses
	T5 1,5%	92 a A	93 a A
T5 6,4%	85 a A	87 ab A	76 b B
T5 12%	25 d A	6 f B	2 d B
T-18 1,5%	67 bc B	86 ab A	94 a A
T-18 6,4%	57 c B	73 cd A	79 b A
T-18 12%	3 e A	7 f A	0 d A
T-196 1,5%	86 a B	79 bc B	99 a A
T-196 6,4%	72 b B	67 d B	97 a A
T-196 12%	20 d B	26 e AB	31 c A

\*Médias seguidas por letras distintas, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, diferem entre si pelo teste Tukey com 5% de probabilidade.

Na tabela 6 é possível observar em *Cattleya tigrina* que tratamentos de 1,5% e 6,4% de teor de água mantiveram níveis de germinação elevados e semelhantes durante o armazenamento em 5°C, com índices acima de 85% durante os nove meses; nesta condição sementes com 12% de água não apresentaram resultados. Para amostras em -18°C com 1,5% e 6,4% de água apresentaram decréscimo na capacidade de germinação ao final de nove meses, mas os índices se mantiveram em torno de 75% para 6,4% de teor de água. Em 12% de água os valores não ultrapassaram 10%, com declínio ao final do experimento. Esta mesma espécie armazenada em nitrogênio líquido apresentou valores crescentes para 1,5% e 6,4% de água durante os nove meses, em 12% de água houve um declínio, mas os valores foram semelhantes estatisticamente. Resumindo, considerando o período estudado e os dados de germinação e IVG, os melhores tratamentos foram conservar as sementes com 1,5 ou 6,4% de teor de água a 5°C ou em nitrogênio líquido.

Para viabilidade os dados não diferiram estatisticamente em 5°C, exceto para 12% de teor de água, apresentando diferença mais acentuada. Em -18°C, os dados de viabilidade se comportam semelhante a 5°C, com decréscimo somente para 12% de água. Sementes armazenadas em nitrogênio líquido não diferiram estatisticamente entre os tratamentos de teor de água de 1,5 e 6,4%, mas o armazenamento com 12% de umidade foi inferior.

**Tabela 6-** Análise do desdobramento da germinação, índice de velocidade de germinação e teste de tetrazólio para a interação entre tratamentos e períodos de armazenamento de sementes de *Cattleya tigrina*.

	Germinação (%)		
	Períodos de armazenamento		
	3 meses	6 meses	9 meses
T5 1,5%	86 ab A*	94 a A	96 a A
T5 6,4%	95 a A	97 a A	93 a A
T5 12%	0 d A	0 d A	0 d A
T-18 1,5%	79 b A	43 c B	35 c B
T-18 6,4%	83 ab A	73 b B	75 b AB
T-18 12%	8 d A	3 d A	2 d A
T-196 1,5%	85 ab B	90 a AB	95 a A
T-196 6,4%	78 b B	97 a B	98 a A
T-196 12%	42 c A	47 c A	40 c A
	IVG		
	Períodos de armazenamento		
	3 meses	6 meses	9 meses
T5 1,5%	10,88 ab B	13,07 ab A	13,35 a A
T5 6,4%	12,89 a A	13,73 aA	12,86 a A
T5 12%	0,00 e A	0,00 e A	0,00 d A
T-18 1,5%	10,01 b A	5,97 d B	4,88 c B
T-18 6,4%	10,17 b A	10,25 c A	10,08 b A
T-18 12%	0,50 e A	0,49 e A	0,19 d A
T-196 1,5%	7,21 c C	11,13 bc B	13,09 a A
T-196 6,4%	7,21 c C	10,10 c B	13,34 a A
T-196 12%	3,32 d A	3,69 d A	5,10 c A
	Teste de tetrazólio (%)		
	Períodos de armazenamento		
	3 meses	6 meses	9 meses
T5 1,5%	94 a A	97 a A	97 a A
T5 6,4%	95 a A	93 a A	94 a A
T5 12%	13 d C	62 c A	30 c B
T-18 1,5%	94 a A	98 a A	95 a A
T-18 6,4%	94 a AB	98 a A	92 a B
T-18 12%	44 c A	48 d A	4 d B
T-196 1,5%	93 a A	95 a A	95 a A
T-196 6,4%	94 a A	97 a A	98 a A
T-196 12%	63 b B	77 b A	72 b A

\*Médias seguidas por letras distintas, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, diferem entre si pelo teste Tukey com 5% de probabilidade.

As análises de germinação para *Cattleya amethystoglossa* mostraram que houve diferença entre as sementes armazenadas e a 5°C a melhor opção foi manter as sementes com 6,4% de teor de água, pois praticamente não houve germinação nas sementes com 1,5% e 12% de água. Em -18°C as sementes com 1,5% não resistiram e perderam a capacidade de germinar. Com 6,4% a germinação cresceu ao longo do armazenamento chegando a 42% e com 12% ocorreu declínio ao longo de nove meses passando de 81 para 2%. Em nitrogênio líquido a situação foi diferente, a 1,5% não houve germinação, com 6,4% e 12% a capacidade de germinação aumentou durante o armazenamento. Assim, as melhores condições para manter as sementes considerando a germinação e o IVG, durante o período estudado, foram 6,4% de teor de água em 5°C ou nitrogênio líquido, embora nesta última opção seja também possível o armazenamento com 12% de teor de água (Tabela 7).

A viabilidade apresentou dados que divergiram da germinação, ou seja, ao longo do período de armazenamento para sementes a 5°C com 1,5% e 6,4% de teor de água a viabilidade estava alta, para 12% houve declínio, mas ainda restando 50% de viabilidade com nove meses de armazenamento. Estes resultados divergiram da germinação, pois com 1,5 e 12% de teor de água o teste de tetrazólio indicou sementes vivas embora não tenha sido observada germinação. Em -18°C a viabilidade apresentou melhores resultados aos seis meses para 1,5% e 6,4%, para 12% inicialmente estava elevada, mas ocorreu declínio ao final de nove meses. Em armazenamento em nitrogênio líquido a viabilidade apresentou-se mais baixa aos três meses, mas ao final do experimento, maior correspondência com a germinação foi observado (Tabela 7).

**Tabela 7-** Análise do desdobramento da germinação, índice de velocidade de germinação e teste de tetrazólio para a interação entre tratamentos e períodos de armazenamento de sementes de *Cattleya amethystoglossa*.

	Germinação (%)		
	Períodos de armazenamento		
	3 meses	6 meses	9 meses
T5 1,5%	2 d A*	2 e A	3 c A
T5 6,4%	87 a A	84 a A	88 a A
T5 12%	14 c A	1 e B	1 c B
T-18 1,5%	1 d A	0 e A	0 c A
T-18 6,4%	10 cd B	43 c A	42 b A
T-18 12%	81 ab A	25 d B	2 c C
T-196 1,5%	1 d A	1 e A	1 c A
T-196 6,4%	76 b B	72 b B	91 a A
T-196 12%	87 a A	90 a A	94 a A
	IVG		
	Períodos de armazenamento		
	3 meses	6 meses	9 meses
T5 1,5%	0,29 de A	0,32 e A	0,48 c A
T5 6,4%	11,62 a A	11,68 a A	12,01 a A
T5 12%	2,06 c A	0,09 e B	0,11 c B
T-18 1,5%	0,07 e A	0,06 e A	0,02 c A
T-18 6,4%	1,49 cd B	6,06 c A	5,60 b A
T-18 12%	9,24 b A	3,27 d B	0,22 c C
T-196 1,5%	0,06 e A	0,04 e A	0,15 c A
T-196 6,4%	9,12 b B	7,49 b C	12,51 a A
T-196 12%	9,26 b C	10,52 a B	12,98 a A
	Teste de tetrazólio (%)		
	Períodos de armazenamento		
	3 meses	6 meses	9 meses
T5 1,5%	32 d C	63 bc B	79 b A
T5 6,4%	93 a A	95 a A	92 a A
T5 12%	69 c A	53 c B	51 d B
T-18 1,5%	20 e C	65 b A	37 e B
T-18 6,4%	85 ab B	94 a A	88 ab AB
T-18 12%	92 a A	91 a A	67 c B
T-196 1,5%	35 d B	27 d C	65 c A
T-196 6,4%	78 bc B	95 a A	96 a A
T-196 12%	85 ab B	95 a A	94 a A

\*Médias seguidas por letras distintas, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, diferem entre si pelo teste Tukey com 5% de probabilidade.

Para a amostra de *Cattleya brevicaulis*, a estatística não apresentou diferença significativa, exceto para sementes com 12% de teor de água a -18°C que produziram valores abaixo de 90% de germinação. As demais combinações não diferiram entre si e também não houve declínio da germinação nas diferentes condições estudadas (Tabela 8).

Para os dados de viabilidade o mesmo pode ser observado, em -18°C com 12% de teor de água apresentaram níveis menores que 90%, para demais condições esta espécie apresentou viabilidade de 95-100% durante todo o período avaliado.

**Tabela 8-** Análise da germinação e do desdobramento do índice de velocidade de germinação e do teste de tetrazólio para a interação entre tratamentos e períodos de armazenamento de sementes de *Cattleya brevicaulis*.

Germinação (%)				
Períodos de armazenamento				
	3 meses	6 meses	9 meses	Média
T5 1,5%	91	89	96	92 ab*
T5 6,4%	100	100	96	99 a
T5 12%	96	88	97	94 a
T-18 1,5%	98	91	97	95 a
T-18 6,4%	89	94	93	92 a
T-18 12%	86	86	71	81 b
T-196 1,5%	96	94	100	97 a
T-196 6,4%	92	99	99	97 a
T-196 12%	95	100	96	97 a
Média	94 A	93 A	94 A	94

IVG			
Períodos de armazenamento			
	3 meses	6 meses	9 meses
T5 1,5%	12,48 ab A	12,48 a A	13,39 a A
T5 6,4%	13,86 a A	13,89 a A	13,58 a A
T5 12%	11,98 abc AB	11,28 abc B	13,73 a A
T-18 1,5%	13,00 ab A	12,78 a A	13,84 a A
T-18 6,4%	10,84 bcd A	12,77 a A	12,67 a A
T-18 12%	9,57 cd A	11,65 ab A	9,55 b A
T-196 1,5%	8,47 d B	8,61 cd B	13,88 a A
T-196 6,4%	8,85 d B	6,81 d B	13,88 a A
T-196 12%	10,44 bcd B	9,25 bcd B	13,39 a A

Teste de Tetrazólio (%)			
Períodos de armazenamento			
	3 meses	6 meses	9 meses
T5 1,5%	95 ab	94 ab	98 ab
T5 6,4%	98 ab	94 ab	95 abc
T5 12%	96 ab	91 b	98 ab
T-18 1,5%	96 ab	96 ab	97 ab
T-18 6,4%	98 ab	90 b	92 bc
T-18 12%	94 ab	96 ab	89 c
T-196 1,5%	95 ab	95 ab	100 a
T-196 6,4%	92 b	98 a	97 ab
T-196 12%	99 a	100 a	100 a

\*Médias seguidas por letras distintas, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, diferem entre si pelo teste Tukey com 5% de probabilidade.

## 5. 2 Análises bioquímicas

Na tabela 9 podem-se verificar as análises bioquímicas em sementes de *Cattleya purpurata*, proteínas solúveis, atividade de SOD (superóxido dismutase), peroxidase (PRX) e produção de malondialdeído (MDA) em função dos tratamentos (combinações de temperatura de armazenamento e teor de água nas sementes) e períodos de avaliação. Para esta espécie os resultados foram não significativos para os tratamentos e para a interação, sendo significativo apenas para os períodos de avaliação (3, 6 e 9 meses), indicando uma diferença entre os períodos avaliados e a produção de cada composto estudado.

Os dados de conteúdo de proteínas solúveis apresentaram maior valor a partir de seis meses até o final do experimento, as atividades de SOD se apresentaram altas no início dos testes e ao final do processo, indicando uma produção maior desse antioxidante, a atividade de peroxidase apresentou altos valores no início dos testes, mas ao decorrer do tempo houve um declínio nos valores, para a produção de malondialdeído, os dados se mantiveram estáveis a partir dos seis meses, havendo maior produção desse produto da peroxidação de lipídeos em decorrência da diminuição das atividades das enzimas antioxidantes. A maior produção se deve a peroxidação dos lipídios das células, principalmente os lipídeos de membranas, podendo com isso haver uma desorganização do metabolismo e componentes celulares, culminando na perda de viabilidade das sementes ao longo do armazenamento.



**Tabela 9-** Análise da determinação de proteínas solúveis totais (Prot Sol), atividade de superóxido dismutase (SOD), peroxidase (PRX) e conteúdo de malondealdeído (MDA) em sementes de *Cattleya purpurata* em tratamentos constituídos pela combinação de temperaturas de armazenamento e teores de água na semente.

	Prot Sol	SOD	PRX	MDA
FV	$\mu\text{g}.50\mu\text{L}$	Abs 560nm (mg prot ) <sup>-1</sup>	nmol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> min <sup>-1</sup>	nmol g MS <sup>-1</sup>
Trat A)	0,86 <sup>ns</sup>	1,66 <sup>ns</sup>	0,54 <sup>ns</sup>	0,17 <sup>ns</sup>
T5C1,5	100,3	0,00088	0,000119	1,04
T5C6,4	100,5	0,00116	0,000123	0,93
T5C12	92,7	0,00113	0,000138	0,83
T-18C1,5	99,2	0,00093	0,000126	0,84
T-18C6,4	103,3	0,00093	0,000141	0,94
T-18C12	97,1	0,00100	0,000148	1,00
T-196C1,5	97,3	0,00097	0,000136	1,04
T-196C6,4	103,3	0,00104	0,000130	0,83
T-196C12	96,6	0,00096	0,000126	0,69
Per (B)	129,74**	31,29**	25,44**	4,14*
3	71,0 b	0,00117 a	0,000172 a	0,53 b
6	113,1 a	0,00073 b	0,000098 c	1,13 a
9	112,7 a	0,00110 a	0,000126 b	1,06 ab
A x B	0,54 <sup>ns</sup>	1,14 <sup>ns</sup>	1,28 <sup>ns</sup>	0,29 <sup>ns</sup>
CV (%)	11,2	21,8	29,5	93,3

FV fatores de variação; CV coeficiente de variação (%)

\*\* significativo a 1%; \* significativo a 5%, <sup>ns</sup> não significativo

A tabela 10 apresenta os dados bioquímicos obtidos com as sementes de *Cattleya tigrina* em diferentes tratamentos e períodos de avaliação durante o armazenamento. Os conteúdos de proteínas solúveis, atividades de SOD e PRX demonstram resultados não significativos em função dos tratamentos. O conteúdo de MDA apresentou diferenças significativas com médias mais baixas para sementes com 12% de teor de água em nitrogênio líquido e sementes super secas (1,5%) em 5°C. Quando se avaliou os períodos de armazenamento os resultados se apresentaram significativos, aos três meses a produção de proteínas solúveis se mostrou mais baixa, tendo um aumento a partir dos seis meses, para SOD e PRX demonstrou resultados semelhantes com maior atividade antioxidantes no início dos três meses, declínio aos seis meses e uma produção intermediária aos nove meses. O conteúdo de MDA aumentou durante os nove meses, sugerindo a degradação das sementes por estresses oxidativos durante o armazenamento. Dados de interação

(A x B) se mostraram não significativos. O coeficiente de variação foi elevado nas avaliações de atividade de PRX e conteúdos de MDA.

**Tabela 10-** Análise da determinação de proteínas solúveis totais (Prot Sol), atividade de superóxido dismutase (SOD), peroxidase (PRX) e conteúdo de malonaldeído (MDA) em sementes de *Cattleya tigrina* em tratamentos constituídos pela combinação de temperaturas de armazenamento e teores de água na semente.

	Prot Sol	SOD	PRX	MDA
FV	µg.50µL	Abs 560nm (mg prot )-1	nmol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> min <sup>-1</sup>	nmol g MS <sup>-1</sup>
Trat A)	1,32 <sup>ns</sup>	0,44 <sup>ns</sup>	1,85 <sup>ns</sup>	4,52 <sup>**</sup>
T5C1,5	99,4	0,00090	0,000120	0,58 ab
T5C6,4	99,4	0,00085	0,000096	0,85 a
T5C12	98,3	0,00098	0,000113	0,71 a
T-18C1,5	97,6	0,00096	0,000093	0,80 a
T-18C6,4	99,0	0,00091	0,000105	0,74 a
T-18C12	99,2	0,00086	0,000121	0,93 a
T-196C1,5	99,8	0,00088	0,000087	0,73 a
T-196C6,4	101,5	0,00091	0,000127	0,94 a
T-196C12	99,8	0,00096	0,000123	0,16 b
Per (B)	2300 <sup>**</sup>	29,88 <sup>**</sup>	18,75 <sup>**</sup>	13,99 <sup>**</sup>
3	69,8 c	0,00113 a	0,000136 a	0,44 b
6	116,2 a	0,00069 c	0,000082 c	0,88 a
9	112,0 b	0,00091 b	0,000110 b	0,83 a
A x B	2,23 <sup>ns</sup>	0,47 <sup>ns</sup>	0,73 <sup>ns</sup>	1,08 <sup>ns</sup>
CV (%)	2,8	23,0	29,4	46,6

FV fatores de variação; CV coeficiente de variação (%)

\*\* significativo a 1%; \* significativo a 5%, <sup>ns</sup> não significativo

Em *Cattleya amethystoglossa* só houve diferença significativa para a avaliação do fator A (combinação entre umidade da semente e ambiente de armazenamento) para conteúdo de proteínas solúveis, com médias bem variáveis durante o desenvolvimento dos experimentos, com maiores valores em temperaturas de 5°C e -196°C com 1,5% de água, para temperaturas de -18°C com 6,4% e 12% de água mantiveram níveis intermediários e os demais se apresentaram mais baixos. Para a atividade de enzimas SOD e PRX e conteúdo de MDA não houve diferença significativa entre os tratamentos. Os dados avaliados por períodos demonstraram significância, o conteúdo de proteínas solúveis apresentou um pico aos seis meses, para as demais análises a atividade de SOD diminui ao longo de

nove meses, a atividade de PRX foi menor aos três e maior aos seis e nove meses de armazenamento. Já o conteúdo de MDA, menor aos três e maior posteriormente indicou deterioração das sementes em estudo. A interação de A x B não apresentou resultados significados de modo que não é necessário o estudo dos desdobramentos das interações entre tratamentos e períodos (Tabela 11).

**Tabela 11-** Análise da determinação de proteínas solúveis totais (Prot Sol), atividade de superóxido dismutase (SOD), peroxidase (PRX) e conteúdo de malondealdeído (MDA) em sementes de *Cattleya amethystoglossa* em tratamentos constituídos pela combinação de temperaturas de armazenamento e teores de água na semente.

	Prot Sol	SOD	PRX	MDA
FV	µg.50µL	Abs 560nm (mg prot )-1	nmol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> min <sup>-1</sup>	nmol g MS <sup>-1</sup>
Trat A)	7,09**	1,20 <sup>ns</sup>	1,05 <sup>ns</sup>	0,684 <sup>ns</sup>
T5C1,5	100,0 abc	0,00208	0,000102	0,60
T5C6,4	99,0 c	0,00093	0,000115	0,71
T5C12	98,4 c	0,00086	0,000094	0,67
T-18C1,5	97,2 c	0,00089	0,000106	0,70
T-18C6,4	102,2 ab	0,00087	0,000105	0,75
T-18C12	100,1 abc	0,00091	0,000099	0,68
T-196C1,5	102,5 a	0,00086	0,000130	0,57
T-196C6,4	99,1 c	0,00091	0,000090	0,72
T-196C12	99,4 bc	0,00097	0,000106	0,44
Per (B)	5297**	5,463**	25,24**	20,93**
3	68,9 c	0,00159 a	0,000078 a	0,29 b
6	118,0 a	0,00070 b	0,000078 b	0,82 a
9	112,5 b	0,00081 b	0,000094 b	0,84 a
A x B	2,42 <sup>ns</sup>	1,107 <sup>ns</sup>	2,03 <sup>ns</sup>	0,85 <sup>ns</sup>
CV (%)	1,9	105,0	33,2	55,0

FV fatores de variação; CV coeficiente de variação (%)

\*\* significativo a 1%; \* significativo a 5%, <sup>ns</sup> não significativo

*Cattleya brevicaulis* (tabela 12) não apresentou resultado significativo para os tratamentos, exceto para atividade de PRX, uma vez que dados de temperaturas de -18°C com 1,5% e -196°C com 6,4% de teor de água apresentaram maiores atividades dessa enzima, a menor atividade em 5°C com 1,5% de água, as demais se mantiveram com valores intermediários. Em relação ao período de avaliação do armazenamento todos os testes bioquímicos avaliados apresentaram resultados significativos. As proteínas solúveis se apresentaram em maior

quantidade aos seis meses, com declínio aos nove meses. Em SOD a maior atividade foi nos três primeiros meses, tendo um declínio aos seis meses e uma retomada de produção aos nove meses. Para PRX, uma enzima que combate a peroxidação de lipídeos, contribuindo para manter a formação de membranas intactas, as sementes apresentaram alta atividade aos três e nove meses, com seis meses os valores se mantiveram intermediários. O conteúdo de MDA aumentou ao longo de nove meses, mantendo níveis mais elevados a partir de seis meses. A interação entre tratamentos não foi significativa, com coeficientes de variação para todas as análises muito divergentes, e altos valores para conteúdo de MDA.

**Tabela 12-** Análise da determinação de proteínas solúveis totais (Prot Sol), atividade de superóxido dismutase (SOD), peroxidase (PRX) e conteúdo de malonaldeído (MDA) em sementes de *Cattleya brevicaulis* em tratamentos constituídos pela combinação de temperaturas de armazenamento e teores de água na semente.

	Prot Sol	SOD	PRX	MDA
FV	µg.50µL	Abs 560nm (mg prot )-1	nmol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> min <sup>-1</sup>	nmol g MS <sup>-1</sup>
Trat A)	1,41 <sup>ns</sup>	0,57 <sup>ns</sup>	3,11**	3,28 <sup>ns</sup>
T5C1,5	104,5	0,00093	0,000121 b	0,65
T5C6,4	105,5	0,00089	0,000148 ab	0,61
T5C12	101,5	0,00084	0,000135 ab	0,89
T-18C1,5	92,5	0,00096	0,000235 a	0,58
T-18C6,4	105,1	0,00082	0,000175 ab	0,80
T-18C12	97,0	0,00092	0,000211 ab	0,51
T-196C1,5	104,2	0,00088	0,000179 ab	0,93
T-196C6,4	106,9	0,00084	0,000231 a	0,49
T-196C12	97,5	0,00098	0,000210 ab	0,92
Per (B)	138,8**	25,77**	13,89**	24,37**
3	71,8 c	0,00110 a	0,000198 a	0,39 b
6	125,4 a	0,00067 c	0,000125 b	0,92 a
9	108,2 b	0,00092 b	0,000222 a	0,82 a
A x B	0,69 <sup>ns</sup>	0,95 <sup>ns</sup>	1,34 <sup>ns</sup>	1,29 <sup>ns</sup>
CV (%)	11,9	24,8	39,0	41,2

FV fatores de variação; CV coeficiente de variação (%)

\*\* significativo a 1%; \* significativo a 5%, <sup>ns</sup> não significativo

## 6 DISCUSSÃO

A longevidade de sementes armazenadas é influenciada pela sua qualidade inicial, teor de água, temperatura e ambiente de armazenamento (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000). Quanto maior a temperatura e umidade no armazenamento a atividade fisiológica é maior, ocorrendo mais rápido a deterioração do material (FLORIANO, 2004).

Sementes ortodoxas podem ser armazenadas com menos de 10% de umidade, mantendo ou aumentando a sua longevidade (BONNER, 1989).

Sementes de orquídeas apresentam comportamento semelhante aos das sementes ortodoxas (PRITCHARD; SEATON, 1993), a vitalidade pode ser favorecida com o período de coleta dos frutos, redução do teor de água e temperatura do armazenamento (SEATON; PRITCHARD, 1990).

Para complementar os dados das análises, sementes de orchidacea, foram submetidas a testes bioquímicos, estes visam avaliar a capacidade de reações antioxidantes e de peroxidação de lipídeos pelas sementes durante o armazenamento. Os radicais livres apresentam funções importantes nos danos causados a moléculas de tecidos vegetais, principalmente quando estes tecidos são submetidos a estresses, como envelhecimento artificial, armazenamento, dessecação de sementes, entre outros. Os mecanismos que afetam as sementes não são totalmente claros, mas acredita-se que os tecidos sofram com as ações de radicais livres influenciando sua mortalidade (HENDRY, 1993).

As evidências da ação de radicais livres em sementes podem ser verificadas quanto à intolerância das mesmas à dessecação. A capacidade de tolerância das membranas aos radicais livres está associada à quantidade de antioxidantes de lipídios solúveis, e isto pode contribuir para tolerar a dessecação e desidratação de tecidos (SENARATNA; MCKERSIE; STINSON, 1985).

Blackman et al. (1991), Walters et al. (2001) e Rosa et al. (2005) sugerem que além de carboidratos, a tolerância à dessecação esta relacionada a um grupo de proteínas (LEA), estas são acumuladas na última fase da maturação das sementes ortodoxas e desempenham papel protetor no estado seco da semente. Estas proteínas estão presentes em plantas e microrganismos e a sua expressão está relacionada à tolerância à dessecação (WISE; TUNACLIFFE, 2004).

Nas amostras analisadas foi possível verificar que o conteúdo de proteínas solúveis nas sementes após a dessecação e armazenamento manteve níveis intermediários após os seis meses, com exceções de algumas espécies, como, *Cattleya brevicaulis* que apresentou um declínio ao longo dos nove meses, para *Cattleya amethystoglossa* o aumento foi possível em algumas condições, como, sementes com 1,5% de teor de água armazenadas a 5°C e nitrogênio líquido, 6,4% e 12% para sementes em -18°C.

Pela análise da atividade de SOD ao longo dos experimentos foi possível verificar que estas enzimas antioxidantes tiveram maior atividade em *Cattleya purpurata* e *Cattleya brevicaulis*, mantendo níveis elevados em três e nove meses, para *Cattleya tigrina* e *Cattleya amethystoglossa* houve declínio na atividade a partir dos seis meses, sendo mais acentuada na avaliação de nove meses.

As peroxidases, enzimas que auxiliam no combate à peroxidação de lipídios e manter a integridade de membranas, apresentaram níveis elevados de atividade para *Cattleya purpurata*, *Cattleya tigrina* e *Cattleya amethystoglossa* nos primeiros meses, mas após seis meses apresentaram declínio, justificando a deterioração das sementes pelo período de armazenamento. Para *Cattleya brevicaulis* as sementes super secas (1,5%) a 5°C apresentaram diminuição na atividade, as demais condições demonstraram aumento durante os nove meses.

Os dados de MDA avaliados em todas as espécies analisadas apresentou aumento para todos os tratamentos, com isso pode ser observado que houve peroxidação de lipídios, desestruturação de membranas e perda de viabilidade das sementes ao longo de nove meses.

## 7 CONCLUSÃO

Entre todas as condições de armazenamento propostas e teores de água das sementes os melhores resultados indicam que as sementes se mantêm mais viáveis por mais tempo com teores de água de 6,4% e mantidas em nitrogênio líquido. Com exceção de *Cattleya purpurata*, as demais espécies também apresentaram conservação em 5°C e -18°C de armazenamento com teores de água em 6,4%. Os resultados das avaliações bioquímicas indicam que, ao longo do tempo de armazenamento, há perda de viabilidade e alterações nos compostos, mesmo nas sementes conservadas em nitrogênio líquido.

## REFERÊNCIAS

- ATWOOD, J. The size of the Orchidaceae and the systematic distribution of epiphytic orchids. **Selbyana**, v. 9, p. 171-186, 1986.
- ÁVILA-DIAZ, I. et al. In vitro propagation of the endangered orchid *Laelia speciosa*. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, v. 99, p. 335-343, 2009.
- BACH, E.E.; CASTRO, O.L. Germinação de sementes de *Cattleya sp.* (orchidaceae) em cultura de tecido visando produção de mudas. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 71, (supl.), p. 1-749, 2004.
- BARBIERI, R.L.; STUMPF, E.R.T. **Origem e evolução de plantas cultivadas**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2008. 909 p.
- BARROS, F. et al. *Orchidaceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB11331>>. Acesso em: 03 Fev. 2016.
- BENZING, D.H. Why is Orchidaceae so large, its seeds so small and its seedlings mycotrophic?. **Selbyana**, v. 5, p. 241-242, 1981.
- BHERING, M. C. et al. **Metodologia do teste de tetrazólio em sementes de feijão. Vigor de sementes**: conceitos e testes. Londrina: ABRATES, 1999.
- BLACKMAN, S.A. et al. Maturation proteins associated with desiccation tolerance in soybean. **Plant Physiology**, v. 96, p. 868-874, 1991.
- BONNER, F.T. Tropical forest seeds: biology, quality and technology. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE SEMENTES DE FLORESTAIS, 2., 1989, Atibaia, SP. **Anais...** São Paulo: SEMA-SP/IF, 1989. p.263-274.
- BRAZ, M.R.S.; ROSSETTO, C.A.V. Condicionamento fisiológico na germinação e no vigor de sementes armazenadas de café. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 7, p. 1849-1856, out. 2008.
- CAMPOS, D.M. **Orquídeas**: manual prático de cultura. Rio de Janeiro: Expressão e Cultura, 1998. 143p.
- CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. **Sementes**: ciência, tecnologia e produção. 4. ed. Campinas: Fundação Cargill, 2000. 588p.
- CERVI, F.; MENDONÇA, E.A.F. Adequação do teste de tetrazólio para sementes de algodoeiro. **Rev. Bras. Sementes [online]**, v. 31, n. 1, p. 177-186, 2009.
- DELOUCHE, J.C. et al. **O teste de tetrazólio para viabilidade de sementes**. Brasília: AGIPLAN, 1976. 103p.
- DRESSLER, R.L. How many orchids species. **Selbyana**, v. 26, p. 155-158, 2005.



DUTRA, D.; KANE, M.E.; RICHARDSON, L. Asymbiotic seed germination and in vitro seedling development of *Cyrtopodium punctatum*: a propagation protocol for an endangered Florida native orchid. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, v. 96, p. 235-243, 2009.

FERREIRA A.G.; BORGHETTI F. **Germinação**: do básico ao aplicado. São Paulo: Artmed, 2004. 323p.

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

FLORIANO, E.P. Armazenamento de sementes florestais. In: UFSM. **Armazenamento de sementes**. Santa Rosa: ANORGS, 2004. Santa Rosa – RS: ANORGS, 10p.

FONSECA, S.C.L.; FREIRE, H.B. Sementes recalcitrantes: problemas na pós-colheita. **Bragantia**, Campinas, v. 62, n. 2, p. 297-303, 2003.

FRANÇA-NETO, J.B. Teste de tetrazólio para determinação do vigor de sementes. In: KRZYZANOWSKI, F.C., VIEIRA, R.D., FRANÇA-NETO, J.B. (ed.). **Vigor de sementes**: conceitos e testes. Londrina: Abrates, 1999.

FREI, B. Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanisms of action. **American Journal of Medicine**, v. 97, (suppl. 3A): p.3A-5S-3A-13S, 1994.

GENTIL, D.F.O. et al. Grau de umidade e temperatura na conservação de sementes de café. **Bragantia**, Campinas, v. 60, n. 1, p. 53-64, 2001.

GIANNOPOLITIS, C.N.; RIES, S.K. Superoxide dismutase. I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, v. 59, p. 309-314, 1977.

GRZYBOWSKI, C.R.S. et al. Viability of barley seeds by the tetrazolium test. **Rev. Bras. Sementes [online]**, v. 34, n. 1, p. 47-54, 2012.

GUIMARÃES, R.M. **Tolerância à dessecação e condicionamento fisiológico em sementes de cafeeiro** (*Coffea arabica*, L.). 2000. 180f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG.

HENDRY, G.A.F. Oxygen. free radical processes and seed longevity. **Seed Science Research**, v. 3, p. 14 I - I 53, 1993.

HOSOMI, S.T. Germinação, viabilidade e armazenamento de sementes de *Cattleya* (Ochidaceae). 2009. 57p. Dissertação (Mestrado - Produção Vegetal) – Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente – SP.

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

HOSSAIN, M. M. et al. The application of biotechnology to orchids. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 32, p. 69-139, 2013.

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

KIKUTI, A.L.P. **Aplicação de antioxidantes em sementes de cafeeiro visando à preservação da qualidade**. 2000. 72f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras - MG.

KNUDSON, L. Non-symbiotic germination of orchid seeds. **Botanical Gazette**, v.73, p. 1-25, 1992.

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

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

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

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

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

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

MARTINS, D.C. et al. Qualidade fisiológica de sementes de café provenientes de diferentes níveis de radiação solar e estádios de maturação. In: VII Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, 7. **Anais...** Araxá - MG, 22 a 25 de agosto de 2011.

MEI et al. Response to temperature stress of reactive oxygen species scavenging enzymes in the cross-tolerance of barley seed germination. **J Zhejiang Univ-Sci B (Biomed & Biotechnol)**, v. 11, n.12, p. 965-972, 2010.

MELLO, C.M.C. **Conservação de sementes de orquídeas do Cerrado**. 2000, 48 f. Dissertação (Mestrado em Biologia). - Universidade de Brasília, Brasília - DF.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends Plant Sci.**, v. 7, n. 9, p. 405-410, 2002.

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

NODARI, R. O. et al. Conservação de frutos e sementes de palmitreiro (*Euterpe edulis* Mart) sob diferentes condições de armazenamento. **Revista Árvore**, v. 22, n.1, p.1-10, 1998.

PRACIAK, A. Seed storage of plant genetic resources. **Seed Science Research**, Cambridge, v. 6, n. 2, p. 71-75, 2008.

PRITCHARD, H.W.; POINTER, L.C.A.; SEATON, T.P. Interspecific variation in orchid seed longevity in relation to ultra-dry storage and cryopreservation. **Lindleyana**, Palm Beach, v. 14, n. 2, p. 92-101, 1999.

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

ROSA, S.D.V.F. et al. Enzimas removedoras de radicais livres e proteínas LEA associadas à tolerância de sementes de milho à alta temperatura de secagem. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 27, n. 2, p. 91-101, 2005.

SENARATNA, T.; MCKERSIE, B.D.; STINSON, R.H. Antioxidant levels in germinating soybean seed axes in relation to free radical and dehydration tolerance. **Plant Physiology**, v. 78, p. 168-171, 1985.

SEATON, P.; PRITCHARD, H. The do's and don't's of orchid seed storage. **The Orchid Review**, v. 98, p. 172-74, 1990.

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

SILVA, W. **O cultivo de orquídeas no Brasil**. São Paulo: Nobel, 1977. 98p.

STANWOOD, F.C. Cryopreservation of seed germplasm for genetic conservation. In: KARTHA, K.K. **Cryopreservation of plant cells and organs**. Boca Raton: CRC, 1985. p. 199-226.

THORNHILL, A.; KOPOWITZ, H. Viability of *Disa uniflora* (Orchidaceae) seeds under variable storage conditions: is orchid gene-banking possible?. **Biological Conservation**, Essex, v. 1, p. 21-27, 1992.

TOLEDO, F.F.; MARCOS FILHO, J. Manual de sementes: tecnologia da produção. São Paulo: **Agronômica Ceres**, 1977. 224p.

TUNES, L.M. et al. Tratamento para superação da dormência em sementes de cevada. **Scientia Agraria**, v. 10, n. 1, p. 15-21, 2009.

VENDRAME, W.; FARIA, R.T.; SORACE, M.; SAHUN, S.A.. Orchid cryopreservation. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 38, n. 3, p. 213-229, 2014.

WALTERS, C. et al. Desiccation damage, accelerated ageing and respiration in desiccation tolerant and sensitive seeds. **Seed Science Research**, v. 11, p. 135-148, 2001.

WISE, J.M.; TUNNACLIFFE, A. POPP the question: what do LEA proteins do? **Trends in Plant Science**, London, v. 9, p. 13-17. 2004.

YU, Q.; RENGEL, Z. Micronutrient deficiency influences plant growth and activities of superoxide dismutases in narrow-leaved lupins. **Annals of Botany**, v. 83, p. 175-182, 1999.