

**VIRGINIA SILVA CARVALHO**

**CRIOPRESERVAÇÃO DE SEMENTES E PÓLEN DE  
ORQUÍDEAS**

Tese apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Fitotecnia, para a obtenção do  
título de “Doctor Scientiae”.

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2006**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

C331c  
2006

Carvalho, Virginia Silva, 1973-  
Criopreservação de sementes e pólen de orquídeas  
/ Virginia Silva Carvalho. – Viçosa : UFV, 2006.  
xi, 69f. : il. ; 29cm.

Orientador: José Maria Moreira Dias.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de  
Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Criopreservação de órgãos, tecidos, etc. 2. Orquídea -  
Semente. 3. Sementes - Conservação. 4. Orquídea - Pólen.  
5. Orquídea - Vitriificação. 6. Germoplasma vegetal -  
Recursos. 7. Orchidaceae. I. Universidade Federal de  
Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 635.93415

**VIRGINIA SILVA CARVALHO**

**CRIOPRESERVAÇÃO DE SEMENTES E PÓLEN DE  
ORQUÍDEAS**

Tese apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-graduação em  
Fitotecnia, para a obtenção do  
título de “Doctor Scientiae”.

**APROVADA: 30 de janeiro de 2006**

---

**Prof. Wagner Aparecido Vendrame  
(Conselheiro)**

---

**Prof. Sérgio Yoshimitsu Motoike  
(Conselheiro)**

---

**Prof. Roberto Ferreira de Novais**

---

**Prof. Wagner Campos Otoni**

---

**Prof. José Maria Moreira Dias  
(Orientador)**

“Os maiores objetivos de nossas vidas não deveriam ser a aquisição de títulos, prestígio, posição social. Nossos maiores objetivos deveriam ser o conhecimento e o aprimoramento de nós mesmos. A melhor forma de nos conhecermos e nos aprimorarmos é nos relacionarmos com o próximo. Ajudando o outro estamos também cuidando de nós. Menosprezando nosso próximo estamos decretando a falência do ser humano.” (Virginia)

A meu marido Gustavo, com  
imenso amor, dedico.

## **AGRADECIMENTO**

A Deus, inteligência suprema e causa primeira de tudo que existe.

A meu marido Gustavo, meu companheiro de jornada nessa vida, pelo amor incondicional.

A meus pais, José e Isabel, meus irmãos Diogo e Fernanda, meus sogros Stella e Ribamar, meus cunhados Daniela, Bruno, Juliana, Bárbara e Mateus, a toda minha família e a todos meus amigos pelo amor e pelo apoio em todos os momentos da minha vida.

A minha grande amiga Cheryl Poulton e sua família por me acolherem em suas casas e em sua vidas e pelos momentos inesquecíveis que passamos juntas.

A minha amiga Nadine Amann pelo companheirismo dessa e de outras vidas.

Aos meus amigos Ian Maguire, Helen Fitting e Pamela Moon pelo auxílio indispensável na condução dos experimentos.

Aos meus orientadores, professores José Maria Moreira Dias e Wagner Aparecido Vendrame pelos exemplos de conduta.

A Universidade Federal de Viçosa e a Universidade da Flórida, pela estrutura física e humana imprescindíveis para o desenvolvimento deste trabalho.

A Dave Baskin, a RF Orchids nas pessoas de Robert Fuchs e Michael Coronado, a Motes Orchids na pessoa de Martin Motes, a Kerry's Bromeliad Nursery nas pessoas de Ty Wilson e Robert McMillan, a Godlove & Son Orchids e Palm Bay Orchids nas pessoas de Matt e Adam Godlove, a Miller's Tropicals nas pessoas de Patty Wilson, Susana e Todd Miller, a Ellenton Growers na pessoa de Lisa Smith, e a todas as demais pessoas que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus companheiros da East Everglades Orchid Society, Richard Brandon, Valerie e David Foster, Fred Armando, Letícia, Clarice, Eduardo

Marcellini, Cheryl Poulton e Tony Castiñeiras por me acolherem nessa sociedade com muito carinho.

A sociedade brasileira responsável pela existência e pela manutenção das universidades públicas.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo auxílio financeiro.

A todos os autores, citados nas referências bibliográficas, pelos trabalhos pioneiros que possibilitaram o desenvolvimento desta tese.

A todos que contribuíram de alguma forma para a elaboração desta tese e para minha formação, meu muito obrigado!

## **BIOGRAFIA**

Virginia Silva Carvalho, filha de José Ribeiro de Carvalho e Isabel Divina da Silva Carvalho, nasceu na cidade de Araxá, Estado de Minas Gerais, aos 22 dias do mês de janeiro de 1973.

Em março de 1991, iniciou o Curso de Agronomia na Universidade Federal de Viçosa, graduando-se em dezembro de 1995.

Exerceu o cargo de Gerente de Pesquisa e Desenvolvimento de Produtos na empresa Biotecnal Ind. Alim. Ltda., incorporada em janeiro de 1999 a Chr. Hansen Ind. e Com. Ltda., no período de janeiro de 1996 a agosto de 1999.

Em março de 2000 ingressou no programa de pós-graduação em Fitotecnia na Universidade Federal de Viçosa.

Em março de 2002 obteve o título de “Magister Scientiae” em Fitotecnia, concentrando seus estudos na área de Propagação Vegetativa e Cultura de Tecidos de Orquídeas.

Ingressou no programa de doutorado em Fitotecnia na Universidade Federal de Viçosa em março de 2002. Participou do programa Doutorado-Sanduíche, desenvolvendo a parte experimental deste trabalho na Universidade da Flórida, concentrando seus estudos na área de Criopreservação de Germoplasma de Orquídeas.

# CONTEÚDO

<b>RESUMO</b> .....	ix
<b>ABSTRACT</b> .....	xi
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	01
<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	04
1. Criopreservação.....	04
1.1. Aspectos históricos.....	05
1.2. Fundamentos da criopreservação.....	06
1.3. Crioprotetores.....	07
1.4. Métodos de criopreservação.....	09
1.4.1. Método clássico.....	09
1.4.2. Método contemporâneo.....	10
1.5. Criopreservação de sementes.....	14
1.6. Criopreservação de pólen.....	16
2. Conservação de germoplasma de orquídeas.....	18
2.1. Aspectos históricos do armazenamento de sementes de orquídeas..	18
2.2. Conservação de sementes de orquídeas.....	21
2.3. Conservação de pólen de orquídeas.....	24
<b>OBJETIVOS</b> .....	26
<b>CAPÍTULO 1</b> Criopreservação de sementes de <i>Dendrobium</i> .....	27
Resumo.....	28
Introdução.....	29
Material e métodos.....	31
Resultados e discussão.....	37
Conclusão.....	46
Bibliografia.....	47
<b>CAPÍTULO 2.</b> Criopreservação de pólen de <i>Dendrobium</i> .....	49

Resumo.....	50
Introdução.....	51
Material e métodos.....	53
Resultados e discussão.....	56
Conclusão.....	60
Bibliografia.....	61
<b>CONCLUSÕES GERAIS.....</b>	<b>63</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>64</b>

## RESUMO

CARVALHO, Virginia Silva, D.S., Universidade Federal de Viçosa, janeiro de 2006. **Criopreservação de sementes e pólen de orquídeas.** Orientador: José Maria Moreira Dias. Conselheiros: Paulo Roberto Cecon, Sérgio Yoshimitsu Motoike, Silvio Lopes Teixeira e Wagner Aparecido Vendrame.

O armazenamento de sementes e pólen tem sido uma preocupação crescente nos programas de melhoramento genético de plantas e tem também grande importância como forma de preservação do material genético. Um método simples para criopreservação de sementes maduras e de pólen de diferentes cultivares do gênero *Dendrobium* foi testado. Para a cultivar *D. Jaquelyn Thomas*, o método de vitrificação incluiu a exposição das sementes à solução de vitrificação (PVS2), em temperatura ambiente ou em banho de gelo, por um período de 1, 2, 3, 4 ou 5 horas. Em seguida, as sementes foram colocadas em nitrogênio líquido (NL), durante 14 dias. Após esse período, foram descongeladas e colocadas para germinar em meio MS, contendo metade da concentração dos sais, acrescido de  $58,5 \text{ mol L}^{-1}$  de sacarose e solidificado com 0,6 % de ágar, depois de ajustado o pH para  $5,7 \pm 0,1$ . A porcentagem de germinação foi determinada após oito semanas de cultivo nesse meio. Para essa cultivar, a maior porcentagem de germinação foi obtida quando as sementes foram deixadas durante uma hora em PVS2 em banho de gelo. Para as demais cultivares, *Dendrobium Sena Red*; *Dendrobium BFC Pink* e *Dendrobium Mini W/RL*, não houve diferença entre os tratamentos em que as sementes permaneceram de uma a três horas em PVS2 em banho de gelo. O tratamento de vitrificação foi essencial para a sobrevivência das sementes após a criopreservação. As sementes que germinaram desenvolveram plantas normais após a vitrificação. O método da vitrificação foi também utilizado na criopreservação de pólen de duas diferentes cultivares do gênero *Dendrobium*: *D. Sena Red Thailand* e *D. Mini W/RL*. A vitrificação incluiu a exposição das políneas ao PVS2 e, em seguida, o armazenamento em NL. Os tratamentos consistiram de um

fatorial 4 x 2, em que políneas permaneceram 1, 2, 3 ou 4 horas em PVS2, em temperatura ambiente ou em banho de gelo. Os controles consistiram de: polinização direta das flores (pólen sem PVS2 e sem NL); pólen por 2 horas em PVS2 em banho de gelo e sem NL; pólen em PVS2 no tempo zero e no NL; e pólen colocado direto no NL sem tratamento de vitrificação. As políneas permaneceram em NL durante 48 horas. Após esse período, foram descongeladas e utilizadas para polinizar novas flores. A sobrevivência das políneas ao processo de criopreservação foi determinada pela formação de cápsulas e de sementes viáveis. Não houve diferença significativa, tanto entre os tratamentos, quanto entre estes e os controles, para as duas cultivares testadas. Todas as cápsulas, de todos os tratamentos, produziram sementes viáveis. O método de vitrificação não foi necessário para criopreservar o pólen das cultivares de *Dendrobium* usadas nesse experimento. Para as cultivares testadas, o simples armazenamento do pólen em NL é suficiente para sua criopreservação.

## ABSTRACT

CARVALHO, Virginia Silva, D.S., Universidade Federal de Viçosa, January, 2006. **Criopreservation of orchid seeds and pollen.** Adviser: José Maria Moreira Dias. Committee members: Paulo Roberto Cecon, Sérgio Yoshimitsu Motoike, Silvio Lopes Teixeira and Wagner Aparecido Vendrame.

A simple, reliable, and low-cost cryopreservation method was developed for mature seeds of *Dendrobium* Jaquelyn Thomas, *D. Sena Red Thailand*, *D. Mini W/RL* and *D. BFC Pink* and for pollen of *D. Sena Red Thailand* and *D. Mini W/RL*. Vitrification treatments performed prior to cryopreservation included exposure of seeds and pollen to plant vitrification solution (PVS2) at room temperature or at ice temperature for one to four or five hours before storage in liquid nitrogen. After a few days seeds and pollen were removed from cryopreservation and germination rates were evaluated. Seeds placed directly on liquid nitrogen did not germinate after removal from cryopreservation. For the treatments evaluated, the highest germination rate was observed in seeds exposed to PVS2 for 1 hour on ice. The vitrification has shown to be essential for the germination success and survival of seeds after removal from liquid nitrogen. Germinated seeds developed into normal plantlets. The pollen of *D. Sena Red Thailand* and *D. Mini W/RL* has shown high germination rates, above 60 % for all treatments and controls. The vitrification treatment has shown not to be essential for the germination success of pollen after the cryopreservation. The vitrification method, a simple and less time-consuming method of cryopreservation, could be appropriate and practical for conservation of many accessions of orchid seeds.

# INTRODUÇÃO

A perda da diversidade biológica tem sido uma das principais preocupações ambientais da atualidade. Independente da causa, se devido à destruição crescente dos ecossistemas ou das mudanças climáticas do planeta, é de suma importância para a sobrevivência e contínua evolução das espécies, que plantas e animais tenham uma ampla reserva de diversidade genética (Ford-Lloyd & Jackson, 1991).

A reserva genética vegetal, ou germoplasma, é um termo utilizado para descrever toda a diversidade genética das espécies cultivadas e de seus parentes selvagens que possam ser de interesse para os fitomelhoristas (Ford-Lloyd & Jackson, 1991; Towill, 2000).

A perda da variabilidade genética e a redução das fontes naturais de germoplasma têm atraído a atenção da comunidade científica internacional e têm sido temas de grandes debates nas duas últimas décadas. Por essa razão, novos métodos de conservação de germoplasma tanto *in situ* quanto *ex situ* vêm sendo desenvolvidos e aplicados para as mais diferentes plantas de interesse econômico e, ou, conservacionista (Bajaj, 1995).

A família Orchidaceae, com cerca de 19.000 espécies, constitui de 7 a 10 % de todas as fanerógamas do planeta (Dressler, 1993). Muitas dessas espécies estão em risco de extinção devido ao extrativismo predatório e à destruição de seus habitats. O problema é mais grave nos trópicos, onde se concentra o maior número de espécies. Dessa forma, faz-se necessário uma ação rápida e efetiva para se evitar a perda de tão valiosos recursos genéticos (Pritchard & Seaton, 1993).

As orquídeas estão se transformando, rapidamente, em uma das principais plantas ornamentais cultivadas. Atualmente, é a segunda flor em vaso mais produzida dos EUA, atrás apenas das poinsetias (*Euphorbia pulcherrima*). Com a crescente demanda por novos híbridos e variedades, os programas de fitomelhoramento são essenciais para fornecer materiais novos e de qualidade superior à indústria. Nesse contexto, o

desenvolvimento de métodos de armazenamento de propágulos das plantas dessa família permitirá o estabelecimento de bancos de germoplasma. Esses bancos facilitarão a procura por materiais para os novos cruzamentos e permitirão o armazenamento de grande variabilidade genética em pequeno espaço e a custos menores.

Embora a conservação *in situ*, por meio da criação de reservas biológicas, seja a melhor forma de se preservar a biodiversidade, nem sempre isso é possível de ser realizado, especialmente em curto espaço de tempo. É necessário, portanto, o desenvolvimento de métodos de conservação dos recursos genéticos *ex situ* para futura reintrodução desse material na natureza. Faz-se necessário a conservação não só das plantas encontradas na natureza, mas também dos milhares de híbridos criados pelo homem, possibilitando aos fitomelhoristas acesso mais rápido às fontes de variabilidade genética.

Os métodos de conservação *ex situ* consistem em se manter as espécies em cultivo fora de seus habitats, seja por meio da propagação clonal, seja por meio do armazenamento de sementes e pólen, ou mais recentemente, em bancos de germoplasma *in vitro*. O método mais utilizado para plantas é o armazenamento de sementes. A Comissão Internacional de Orquídeas (International Orchid Commission) recomendou que uma rede mundial de bancos de germoplasma de sementes de orquídeas fosse criada (Greatwood, 1984), embora, até o momento, essa rede não tenha sido estabelecida, de fato. Para que isso realmente aconteça, é preciso, primeiramente, estabelecer protocolos eficientes para o armazenamento de sementes, pólen, gemas, embriões somáticos, dentre outras partes da planta, visando à conservação efetiva desses materiais por longos períodos de tempo, em bancos de germoplasma (Pritchard & Seaton, 1993). Até o momento, as coleções de orquídeas são mantidas em orquidários, públicos ou privados. Não há registro de bancos de germoplasma de sementes, pólen e de qualquer parte vegetativa de orquídeas na literatura revisada (GRIN, 2005).

A maneira mais simples de se conservar valiosos recursos genéticos *ex situ* é na forma de sementes. A formação de bancos, não apenas de

sementes, porém também de pólen de orquídeas, pode permitir a conservação de grande diversidade genética em pequenos espaços, por longos períodos de tempo e a menores custos. Além disso, bancos de germoplasma constituem formas mais seguras de armazenamento do material genético do que a manutenção de plantas em orquidários, onde sofrem o risco de serem atacadas por fitoparasitas, por exemplo. Entretanto, há que se mencionar que o armazenamento de sementes e pólen não deve ser o único método adotado para a conservação de germoplasma de orquídeas e, sim, ser uma alternativa a mais à forma de preservação já existente.

As orquídeas são plantas perenes, de crescimento lento e longo período juvenil, levando, em média, de quatro a cinco anos para ser possível a avaliação da qualidade floral das progênes e obtenção de novas sementes. Além disso, como uma única cápsula pode chegar a produzir até mais de um milhão de sementes, muitas vezes é inviável a semeadura e a condução de todas as plantas ao mesmo tempo, o que requer o desenvolvimento de métodos de preservação da viabilidade das sementes por longos períodos de tempo. Do mesmo modo, a coleta e o armazenamento de pólen permitiriam sua utilização em cruzamentos entre plantas que florescem em épocas ou locais distintos.

Nesse contexto, o desenvolvimento de protocolos para preservação de sementes e pólen de orquídeas, mantendo-os viáveis por longos períodos de tempo, trará vários benefícios. Permitirá avaliar apenas parte da progênie de um cruzamento e, somente se esta for comprovadamente superior, utilizar-se das demais sementes, economizando tempo, espaço, material e mão-de-obra. Será possível retirar cápsulas e pólen de plantas na natureza, sem ser necessário a remoção das plantas de seu local de origem. Possibilitará a formação de bancos de germoplasma, sem a necessidade de uma reprodução constante do material e, dessa maneira, a produção poderá ser escalonada, melhor planejada e com custos de manutenção reduzidos.

# REVISÃO DE LITERATURA

## 1. Criopreservação

A criopreservação é a conservação de material biológico em temperaturas ultra-baixas, até  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  em nitrogênio líquido (NL), mantendo as características do material, após o descongelamento. A criopreservação tem se mostrado eficiente para o armazenamento de várias partes das plantas como: sementes, pólen, embriões somáticos e zigóticos, partes vegetativas como raízes, bulbos, tubérculos, gemas, ápices meristemáticos, dentre outras. Esse método pode assegurar a conservação do material por longos períodos de tempo, pois, nas citadas temperaturas, o metabolismo celular fica tão reduzido que a deterioração biológica é praticamente paralisada (Bajaj, 1995).

A criopreservação é considerada o método ideal para a conservação de germoplasma, por permitir o armazenamento de materiais biológicos por tempo indefinido, mantendo sua estabilidade genética e suas características fenotípicas, usando pouco espaço e requerendo muito pouca manutenção (Engelmann, 1997).

Embora sendo uma ciência relativamente nova, a criobiologia ganhou maior destaque nos últimos anos. E diversos protocolos de criopreservação já foram desenvolvidos para espécies de plantas de propagação vegetativa, gramíneas, ornamentais, frutíferas tropicais e temperadas, leguminosas e oleaginosas, medicinais e aromáticas (Santos, 2001). Várias técnicas têm sido empregadas, incluindo a criopreservação de protoplastos, suspensões celulares, gemas apicais e laterais, meristemas, sementes, embriões somáticos e zigóticos, pólen, dentre outros (Bajaj, 1995; Reed, 2002).

Com base na literatura revisada, ainda são poucos os estudos sobre os custos de implantação do sistema e manutenção de materiais vegetais em NL, porém alguns trabalhos vêm confirmando a viabilidade do uso da criopreservação, também sob o ponto de vista econômico. Em um trabalho

realizado por Hummer & Reed (2000), citado por Engelmann (2004), o custo anual de manutenção de um acesso de uma fruteira temperada é da ordem de 900 dólares, se mantida a campo; 23 dólares, quando armazenada *in vitro* sob condições de crescimento mínimo; e de apenas um dólar, quando criopreservada. Deve-se, entretanto, adicionar um custo inicial de 50 a 60 dólares para criopreservar o material. O custo de manutenção anual da coleção de mandioca do Centro Internacional para Agricultura Tropical (CIAT – International Center for Tropical Agriculture, Cali, Colômbia) que possui cerca de 5.000 acessos, é de 5.000 dólares para os acessos criopreservados, contra 30.000 dólares dos acessos mantidos em cultivo mínimo *in vitro* (Engelmann, 2004).

É preciso ressaltar, no entanto, que a criopreservação não deve ser tomada como o método que irá substituir os métodos tradicionais de conservação *ex situ*. A criopreservação oferece aos responsáveis pelos bancos de germoplasma uma alternativa a mais, para incrementar as formas de conservação de germoplasma já existentes. A opção por determinado método de conservação irá depender do período de conservação desejável, das espécies a serem conservadas, da parte da planta a ser preservada, da disponibilidade de mão-de-obra e dos recursos financeiros disponíveis. Espera-se que, em poucos anos, a criopreservação se torne mais e mais utilizada no armazenamento de materiais vegetais e, conseqüentemente, na conservação das fontes genéticas vegetais por longos períodos de tempo (Engelmann, 2004).

### **1.1. Aspectos históricos**

O desenvolvimento da criopreservação de células e tecidos vegetais seguiu os mesmos avanços feitos em mamíferos, embora algumas décadas mais tarde. O primeiro trabalho, relatando a sobrevivência de tecidos vegetais à exposição a ultra-baixas temperaturas, foi realizado por Sakai em 1960. Esse autor demonstrou que brotos de amoreira podiam suportar o congelamento em NL, após a desidratação dos mesmos. Contudo, os avanços foram lentos e quase uma década passou, até que fosse

demonstrado o uso do dimetil sulfóxido (DMSO) como agente crioprotetor em células vegetais. Esse trabalho foi publicado em 1968 por Quatrano e, em 1971, Latta desenvolveu um protocolo para criopreservação de células de cenoura em cultura. Essas células sobreviveram após o congelamento em NL. O método aplicado nesses trabalhos seguiu os procedimentos clássicos que já haviam sido empregados com sucesso para outros materiais biológicos: uso de crioprotetores químicos; desidratação e congelamento lentos, seguidos de rápida imersão em NL; descongelamento rápido; lavagem e recuperação do material (Engelmann, 1997).

Os trabalhos, envolvendo a conservação de materiais vegetais, realizados nas décadas de 70 e 80, denominados de métodos clássicos, foram baseados na sequência de eventos acima descritos (Kartha, 1985). Nos últimos anos, entretanto, novas técnicas foram desenvolvidas, permitindo a aplicação da criopreservação para vários tipos de tecidos e órgãos vegetais. Os métodos clássicos de criopreservação envolviam a desidratação induzida pelo congelamento lento, enquanto que as novas técnicas são baseadas na vitrificação (Fahy *et al.*, 1984).

## **1.2. Fundamentos da criopreservação**

A criopreservação tem sido utilizada como um meio efetivo e seguro para a conservação de germoplasma (Towill, 2002). De modo geral, a criopreservação consiste em levar o material vegetal a um estado de não-divisão e de metabolismo praticamente zero, o que é obtido por meio da exposição do material a ultra-baixas temperaturas, porém, as células devem manter sua estrutura intacta, o que permitirá o retorno a suas atividades normais, após o descongelamento (Bajaj, 1995).

O ponto mais crítico do processo é o teor de água no material a ser criopreservado. Teores muito baixos levam à desidratação excessiva e morte das células, e aqueles elevados levam à formação de cristais de gelo no interior das células; esses, por sua vez, levam à ruptura do sistema de membranas celulares, à perda da permeabilidade seletiva das células e da compartimentalização celular. As células, nesse caso, colapsam e morrem.

A injúria mecânica, sofrida pelas células, decorre da expansão da água, durante o congelamento, e da conformação espacial dos cristais de gelo. Evitar a formação dos cristais de gelo é o principal objetivo a ser alcançado na definição de um protocolo de criopreservação de determinado material biológico. Os materiais vegetais normalmente utilizados apresentam altos teores de água em suas células. É necessário, portanto, uma desidratação do material antes de ele ser congelado. A desidratação, por sua vez, não é um processo simples, pois a água exerce inúmeras funções biológicas fundamentais nas células. A água é um importante solvente, meio de transporte, tamponante e um constituinte essencial e estabilizador da estrutura de macromoléculas e organelas. O êxito de um protocolo de criopreservação dependerá da definição do teor de água que deverá ser baixo o suficiente para evitar a formação de cristais de gelo, mas não tão baixo que cause injúria por desidratação excessiva (Santos, 2001).

### **1.3. Crioprotetores**

Grandes avanços na criopreservação de material biológico foram possíveis, quando se descobriu que certas substâncias eram capazes de proteger as células contra as injúrias causadas pela desidratação. Esse efeito protetor foi primeiramente descrito para o glicerol e, mais tarde, para o DMSO. Essas substâncias, em especial o DMSO, interferem na formação dos cristais de gelo, embora o mecanismo dessa interferência não seja, ainda, conhecido. O DMSO tornou-se a substância crioprotetora mais utilizada (Simione, 1998), embora haja indícios de ter efeitos fisiológicos deletérios. Se há esse efeito prejudicial, ele parece ser reversível tão logo o crioprotetor seja removido. Substâncias que não penetram na célula, como a sacarose, devem ter um modo de ação diferente do DMSO e glicerol, e devem ser responsáveis pela desidratação causada por uma maior concentração de solutos no meio externo da célula (Franks, 1982).

Os crioprotetores podem ser definidos como substâncias químicas que reduzem a injúria sofrida pela célula, durante seu congelamento e descongelamento. Há dois tipos de crioprotetores com relação a sua

habilidade em penetrar as membranas celulares. Propileno glicol, etileno glicol, glicerol e DMSO são crioprotetores capazes de passar pelas membranas celulares. Amido, polivinilpirrolidona (PVP) e óxido de polietileno não são capazes de penetrar as membranas celulares. O glicerol tem um comportamento distinto, uma vez que, penetra as membranas, se for adicionado à temperatura ambiente, mas é incapaz de penetrar se for usado a 0 °C. Os crioprotetores que não penetram nas células atuam desidratando as células em temperaturas próximas ao congelamento e, dessa forma, são capazes de reduzir a atividade de água no interior da célula (Efendi, 2003).

Açúcares solúveis e outros compostos com hidroxilas livres, capazes de formar pontes de H, podem substituir a água mantendo as estruturas hidrofílicas na orientação hidratada, mesmo quando a água não está mais presente (Sakai & Yoshida, 1968; Koster, 1991). Em células animais, a proteção dos açúcares, que não são capazes ou têm baixa capacidade de penetração nas células, é bem menor do que a de outras substâncias capazes de penetrar nas células, como glicerol, DMSO e etileno glicol (Sakai & Yoshida, 1968). Porém, trabalhos mais recentes mostram que alguns açúcares, como a sacarose e a trealose, mantêm a estabilidade das membranas biológicas, evitando a fusão das mesmas, durante a desidratação e a cristalização da água, no processo de congelamento. Esses açúcares interagem com a camada lipídica, durante a desidratação. Não se sabe, ainda, ao certo, o mecanismo envolvido, não obstante esses açúcares são capazes de preservar a estrutura e as funções dos componentes das duas faces das membranas celulares e, ainda, das proteínas solúveis associadas (Crowe *et al.*, 1988). É importante realçar que, na natureza, a sacarose e outros açúcares exercem um papel muito importante, aumentando a resistência dos vegetais, de climas frios e temperados, às baixas temperaturas (Sakai & Yoshida, 1968).

## **1.4. Métodos de criopreservação**

### **1.4.1. Método clássico**

Os primeiros protocolos de criopreservação de tecidos vegetais, denominados de método clássico, utilizavam o congelamento em duas fases: uma, em que o congelamento é lento, sendo a temperatura reduzida, a uma velocidade definida ( $1$  a  $10$  °C  $\text{min}^{-1}$ ), para valores próximos de  $-40$  °C, usando um congelador programável, ou criostato; seguida de outra, em que o congelamento é rápido, por meio da imersão direta do material em NL (Engelmann, 1997).

Esses métodos foram baseados nos eventos físico-químicos que ocorrem durante o processo de congelamento em condições naturais, os quais foram descritos por Mazur (1969). À medida que a temperatura decresce, aproximando-se de  $0$  °C, a célula e seu meio externo atingem um estado de super-resfriamento e, posteriormente, ocorre a formação de gelo no meio extracelular. O conteúdo da célula super-resfriada permanece descongelado, possivelmente porque a parede celular e a membrana plasmática impedem que os cristais de gelo, nos espaços intercelulares, penetrem na célula e desencadeiem o congelamento do citoplasma. Se o congelamento ocorre lentamente, a água se difunde do interior da célula para o meio externo, devido à diferença de pressão de vapor de água, que é maior dentro da célula que nos espaços intercelulares congelados e é convertida em gelo na superfície das células ou entre o protoplasto e a parede celular. Esse fenômeno é chamado de desidratação induzida por congelamento. Com isso, a célula desidrata-se, reduzindo a um mínimo ou removendo completamente a água livre presente e evitando, assim, a formação de gelo em seu interior. Como resultado, a concentração da solução celular aumenta e a célula perde turgor. Quando o potencial hídrico das células parcialmente desidratadas iguala-se àquele do gelo extracelular, é estabelecido um equilíbrio e a desidratação pára, contanto que a temperatura permaneça constante. Entretanto, se o congelamento da célula for muito rápido, a desidratação por congelamento não ocorre e as células

se tornam, cada vez mais super-resfriadas e, eventualmente, a solução intracelular, que contém alto teor de água livre, congela-se, formando cristais de gelo e causando injúria mecânica às células.

Em condições experimentais, quando as células atingem a temperatura de pré-congelamento, a maior parte da água congelável já escapou, formando gelo no meio externo. Assim, a exposição à temperatura do NL tem muito pouco efeito adverso (Kartha, 1985).

Em resumo, o método de congelamento lento é um procedimento complexo, no qual a velocidade de congelamento e a temperatura de pré-congelamento têm um papel crítico na preservação da viabilidade do material.

#### **1.4.2. Método contemporâneo**

O método contemporâneo de criopreservação é baseado na vitrificação (Fahy *et al.*, 1984; Sakai *et al.*, 1990, 1991a, 1991b).

Nas técnicas de criopreservação clássicas, a remoção da água intracelular e o comportamento da água restante no interior das células, durante os processos de congelamento e descongelamento, são críticos para o sucesso do método. Ao contrário desses métodos, baseados no congelamento, nos procedimentos baseados na vitrificação a desidratação das células acontece antes do congelamento. Essa desidratação é feita, colocando o material em contato com substâncias químicas concentradas e, em seguida, por um rápido congelamento. Como consequência, os fatores que afetam a formação de gelo intracelular são evitados. Assim sendo, o ponto crítico desse processo é a desidratação do material e não o congelamento em si, como no método clássico. Desse modo, é necessário que o material seja desidratado para um teor de água apropriado e compatível para se obter altas taxas de sobrevivência. Uma outra vantagem da vitrificação sobre o método clássico é não ser necessário o uso de criostatos, facilitando o processo de criopreservação e reduzindo os custos (Engelmann, 1997).

A vitrificação, embora tenha diversas definições, é, basicamente, a solidificação de um líquido, devido não a sua cristalização, mas a uma elevação extrema da viscosidade do mesmo, durante o congelamento (Fahy *et al.*, 1984). Os estudos realizados por esses autores, ao trabalharem com rins de coelho, permitiram lançar as bases dos métodos empregados atualmente na vitrificação de materiais biológicos. O método da vitrificação foi empregado com êxito na criopreservação de células vegetais, no início da década de noventa, notabilizando os trabalhos de Sakai *et al.* (1990, 1991a, 1991b), Yamada *et al.* (1991) e Nishizawa *et al.* (1993). Nos citados trabalhos, utilizaram-se substâncias crioprotetoras altamente concentradas, as quais foram denominadas PVS2 – solução de vitrificação para plantas. Essas substâncias permitem que as células vegetais sejam vitrificadas, quando rapidamente congeladas em NL. O PVS2 atua como um agente crioprotetor e dessecante, evitando a injúria causada pelo congelamento da água intracelular. Esses trabalhos possibilitaram grande avanço na criobiologia vegetal, tornando possível o emprego de métodos mais simples e de baixo custo na conservação de germoplasma vegetal.

Em suma, a vitrificação consiste em se utilizarem soluções altamente concentradas para preparar os tecidos antes da imersão no NL (Sakai *et al.*, 1990; Thammasiri, 2000) e pode ser também definida como o processo de transição da água diretamente da fase líquida para uma fase amorfa ou vítrea. O estado sólido, nesse caso, é uma solução super-saturada de alta-viscosidade, o que lhe confere as propriedades mecânicas de um sólido, porém, sem a formação dos cristais de gelo, que são altamente prejudiciais e levam ao rompimento das células e morte dos tecidos. A transição para o estado vítreo não envolve mudanças químicas, mas apenas mudanças físicas na viscosidade do líquido.

O estado vítreo traz vários benefícios para a célula desidratada: limita a perda de água; limita a cristalização de sais e proteínas no citoplasma; protege contra mudanças no pH, em consequência da remoção da água; e previne o colapso celular, quando a desidratação é excessiva. A vitrificação restringe a difusão de substâncias dentro da célula, levando a um estado de quiescência metabólica, resultando na prevenção de reações químicas

dependentes do processo de difusão. Devido a essas características do estado vítreo, a deterioração biológica é levada a níveis insignificantes, assegurando a estabilidade durante o período de quiescência (Koster, 1991).

A vitrificação é feita, geralmente, em duas etapas. Na primeira, chamada de pré-vitrificação, há um aumento na concentração osmótica, devido à aplicação de crioprotetores capazes de passar pela membrana celular. Na segunda, fase de desidratação propriamente dita, o material é imerso em uma solução de vitrificação. A solução de pré-vitrificação, descrita por Nishizawa *et al.* (1993), é composta por 2 mol L<sup>-1</sup> de glicerol e 0,4 mol L<sup>-1</sup> de sacarose. O material é imerso nessa solução por 20 a 60 minutos. Essa solução, na realidade, não leva a aumento significativo da concentração osmótica no interior da célula, uma vez que o glicerol e a sacarose não são capazes de penetrar nas células em tão curto espaço de tempo. Entretanto, a aplicação dessa solução tem-se mostrado benéfica, uma vez que aumenta a permeabilidade dos crioprotetores à membrana celular e previne danos às células, durante a exposição à solução de vitrificação (Towill, 2002).

Sendo a concentração osmótica da solução de vitrificação muito alta e o tempo de contato dela com o material biológico relativamente curto, a principal função dessa solução é desidratar o material a ser criopreservado, concentrando os agentes crioprotetores permeáveis e outras substâncias citoplasmáticas no interior das células. A solução de vitrificação retira água do interior das células fazendo com que a solução intracelular se solidifique, formando um estado amorfo ou vítreo, quando colocada em NL (Grout & Roberts, 1995; Wang *et al.*, 1998).

Sakai *et al.* (1990) desenvolveram a solução de vitrificação PVS2 que é composta por 30 % de glicerol, 15 % de etileno glicol, 15 % de DMSO e 0,15 mol L<sup>-1</sup> de sacarose. Em trabalhos posteriores, desenvolvidos por essa mesma equipe, a concentração de sacarose utilizada foi de 0,4 mol L<sup>-1</sup> (Nishizawa *et al.*, 1993). O PVS2 é a solução mais utilizada para a vitrificação de material vegetal. Essa solução tem sido utilizada na criopreservação de várias espécies e de diferentes materiais vegetais. Alguns autores atribuem a baixa viabilidade do material, após a criopreservação, à toxidez da solução de vitrificação ou de alguns de seus

componentes, porém até o momento não foi possível provar essa hipótese (Towill, 2002).

Após o tratamento com a solução de vitrificação, o material é, então, colocado diretamente em NL, permanecendo armazenado nessas condições.

O descongelamento pode ser feito de modo lento à temperatura ambiente ou rapidamente utilizando-se um banho-maria a 37 a 40 °C (Bajaj, 1995). Segundo Mazur (1969), o descongelamento lento é menos deletério para células vegetais do que o rápido. Para as células vegetais, a desplasmólise rápida pode levar à morte da célula. O método de descongelamento utilizado depende do tipo de material que está sendo preservado. Como exemplo, sementes ortodoxas podem ser descongeladas lentamente à temperatura ambiente e, aparentemente, sem nenhum efeito prejudicial às mesmas (Towill, 2000, 2002).

Logo após o descongelamento do material biológico, a solução de vitrificação é retirada e uma solução concentrada de sacarose é adicionada para o restabelecimento dos níveis normais de concentração da solução intracelular (Wang *et al.*, 1998).

Geralmente, a viabilidade do material, após a criopreservação, é medida pelo crescimento em meio de cultivo adequado. Embora alguns outros métodos, como o uso de corantes que medem a atividade biológica, possam ser utilizados, esses métodos podem superestimar a sobrevivência das células ao processo de congelamento (Bajaj, 1995). O crescimento do material criopreservado em meio de cultivo adequado é o teste de viabilidade mais seguro para tecidos vegetais em geral (Efendi, 2003).

Significativo progresso tem sido alcançado nos últimos anos na área de criopreservação de plantas com o desenvolvimento de vários protocolos baseados na vitrificação. A importância dessas novas técnicas reside na simplicidade operacional das mesmas (Engelmann, 1997).

A vitrificação tem sido utilizada na criopreservação de diferentes partes vegetais, tais como embriões somáticos e zigóticos, gemas apicais e laterais, protoplastos, suspensões celulares, calos, meristemas, dentre outros (Sakai *et al.*, 1990; Sakai *et al.*, 1991a, Sakai *et al.*, 1991b, Yamada *et*

*al.*, 1991; Nishizawa *et al.*, 1993). A vitrificação tem permitido a simplificação dos protocolos de criopreservação, reduzindo o trabalho e os custos e aumentando a viabilidade do material preservado. Além disso, os criostatos, que são aparelhos sofisticados e, portanto, de maior custo, não são necessários, uma vez que o material é imerso diretamente em NL. Dessa forma, devido à simplicidade dos protocolos para vitrificação, este parece ser o método a ser utilizado para criopreservar materiais biológicos de naturezas diversas. Além disso, alguns trabalhos mostram que materiais biológicos, quando armazenados em -20 e em -70 °C mostram sinais de deterioração biológica com o passar do tempo. Assim, para a conservação de germoplasma, por longos períodos de tempo, o material deve ser mantido em NL (Bajaj, 1995).

A eficiência do processo de criopreservação dependerá dos resultados obtidos em cada uma das seguintes etapas: preparo do material, criopreservação e descongelamento do material (Towill, 2002).

A criopreservação é relativamente mais simples de ser aplicada na conservação de sementes e pólen do que em outras partes da planta (Towill, 2002).

### **1.5. Criopreservação de sementes**

A tolerância à desidratação varia entre sementes de diferentes espécies. As sementes podem ser agrupadas em resistentes ou ortodoxas, intermediárias e sensíveis ou recalcitrantes à desidratação. Sementes ortodoxas podem ter sua umidade reduzida e serem colocadas diretamente em NL, tanto na fase líquida, quanto no vapor de nitrogênio, não sendo necessário o congelamento lento e gradativo das mesmas. Para essas sementes, o ponto crítico é a redução do teor de água inicial, o qual pode ser feito mediante uso de agentes de desidratação, como sílica-gel, cloreto de cálcio, glicerol e DMSO. O descongelamento pode ser feito à temperatura ambiente, sem maiores prejuízos para as sementes. O ponto crítico na criopreservação de sementes ortodoxas é definir o teor de água ideal antes da imersão em NL (Towill, 2000, 2002).

Há vários fatores a serem considerados, antes de se escolher o método a ser empregado na conservação de sementes ortodoxas. Os custos de implantação e de manutenção dos bancos de germoplasma, a mão-de-obra disponível e a longevidade que se quer alcançar influenciam diretamente na escolha do método. O tipo de semente também influenciará na escolha do método. Como exemplo, sementes de cevada armazenadas pelo método tradicional com baixo teor de água (5 %) e a -20 °C mantêm a viabilidade durante décadas, porém sementes de alface nas mesmas condições, perdem a viabilidade em poucos anos. Assim sendo, é preciso definir a longevidade requerida. Os custos e a escolha do método de conservação também devem ser levados em consideração (Towill, 2002).

A criopreservação é um método simples, de menor custo inicial e de manutenção e que permite o armazenamento do material biológico por longos períodos de tempo (Towill, 2002).

A criopreservação é utilizada na conservação de sementes ortodoxas, principalmente em espécies cuja longevidade das sementes é baixa ou nas espécies que correm risco de extinção. O Centro Nacional para Preservação dos Recursos Genéticos (NCGRP - National Center for Genetic Resources Preservation, Fort Collins, CO, EUA) conserva 37.654 acessos, num total de mais de 360.629 sementes, na fase de vapor do NL. A Agência Nacional para Pesquisa de Recursos Genéticos Vegetais (NBPGR – National Bureau for Plant Genetic Resources, New Delhi, Índia) conserva 1.200 acessos de 50 espécies diferentes, sendo, em sua maioria, plantas medicinais em risco de extinção. A criopreservação é também utilizada em vários jardins botânicos. Mais de 110 acessos de espécies raras ou ameaçadas estão criopreservadas no “Perth Royal Botanic Garden”, na Austrália. O jardim botânico de Cincinnati (EUA) também conserva sementes de espécies raras ou ameaçadas em NL (Engelmann, 2004).

No caso de sementes ortodoxas, deve-se, preferencialmente, trabalhar com sementes maduras por resistirem melhor à desidratação (Towill, 2002).

## 1.6. Criopreservação de pólen

O armazenamento de pólen é uma maneira de se conservar parte da diversidade genética de uma forma acessível e facilmente utilizável pelos melhoristas de plantas; e pode ser uma maneira rápida e prática de se iniciar um banco de germoplasma (Reed, 2002).

O armazenamento de pólen é semelhante ao de sementes, embora o teor de água neste seja mais fácil de ser ajustado. A qualidade do pólen é muito importante. Grãos de pólen coletados de anteras muito novas ou velhas não sobrevivem bem ao armazenamento. Plantas estressadas produzem pólen com baixa fertilidade. O armazenamento de pólen, bem como o de sementes, requer muito pouco espaço físico e, principalmente, preserva grandes quantidades de material genético (Towill, 2002).

Assim como nas sementes, a tolerância dos grãos de pólen à perda de água é variável. Os grãos de pólen podem ser agrupados em resistentes ou sensíveis. Grãos de pólen resistentes podem ser desidratados a teores baixos de água, 5 a 10 %, sendo utilizados os mesmos métodos aplicados às sementes. Em seguida, podem ser colocados diretamente em NL e descongelados à temperatura ambiente sem maiores problemas. Assim como as sementes, o pólen pode ser armazenado a temperaturas de -20, -4 e +4 °C, porém tem sua longevidade reduzida. Em baixos teores de água, quanto menor a temperatura de armazenamento, maior a longevidade das sementes e, também do pólen. A capacidade de fertilização *ex vitro* é o método padrão usado para verificar a viabilidade do pólen. Alguns métodos utilizam a germinação do pólen *in vitro*, mas estes apenas estimam a viabilidade do mesmo. O pólen de várias espécies é tolerante à desidratação, tendo comportamento semelhante ao das sementes ortodoxas, porém, normalmente plantas que possuem sementes ortodoxas, possuem pólen sensível e vice-versa (Towill, 2002).

Para o melhorista de plantas, um importante aspecto da criopreservação é o armazenamento de pólen. O pólen armazenado em NL é capaz de manter sua viabilidade por longos períodos de tempo. A criopreservação de pólen permite: o cruzamento entre plantas que florescem

em épocas diferentes; o cruzamento entre plantas que crescem em locais diferentes e distantes; menor transmissão de doenças que podem ter como vetores os próprios polinizadores; e conservação do germoplasma por longos períodos de tempo (Bajaj, 1995).

Melhoristas de plantas têm armazenado pólen em NL, como forma de aperfeiçoamento dos programas de melhoramento genético. O pólen é importante para a conservação de material genético de várias espécies e vem sendo estocado em vários institutos. Na Índia, o NBPGR (National Bureau for Plant Genetic Resources) possui pólen criopreservado de 65 acessos pertencentes a diferentes espécies. O Instituto Indiano para Pesquisa em Horticultura (IIHR – Indian Institute for Horticultural Research, Bangalore) conserva pólen de 600 acessos pertencentes a 40 espécies de 15 diferentes famílias, sendo que alguns estão estocados há mais de 15 anos. Nos EUA, o NCGRP (National Center for Genetic Resources Preservation) conserva o pólen de 13 cultivares de ervilhas e de 24 espécies de *Pyrus* (Engelmann, 2004).

O principal uso do germoplasma é no melhoramento de plantas, por meio de reprodução sexual, o que requer cruzamentos controlados entre os progenitores selecionados. O armazenamento de pólen facilita esse processo: o fitomelhorista não necessita esperar pelo crescimento e florescimento da planta para obter o parental masculino. Isso traz benefícios óbvios para as espécies que tenham longo período vegetativo, ou que floresçam poucas vezes ao ano ou ainda para algumas plantas que são propagadas vegetativamente. A conservação de pólen deve, por essas razões, ser integrada aos bancos ativos de germoplasma. O material genético da mãe será perdido se o armazenamento de pólen for a única forma de conservação empregada. Por essa razão, a conservação de pólen é uma alternativa adicional para a conservação de germoplasma e não um substituto para o armazenamento de sementes ou clones (Towill, 2000).

## 2. Conservação de germoplasma de orquídeas

### 2.1. Aspectos históricos do armazenamento de sementes de orquídeas

O primeiro trabalho envolvendo o armazenamento de sementes de orquídeas foi o de Jancke (1915), citado por Pritchard & Seaton (1993). Segundo esse autor, as sementes mantidas em recipientes, como tubos de ensaios e envelopes, em locais frios e no escuro, mantém a viabilidade por até um ano. Embora sementes de *Cattleya aurantiaca* mantivessem 40 % de viabilidade, após 3 anos, em temperatura ambiente, essa capacidade de germinação em sementes velhas não é comum (Knudson, 1924, 1934). Sementes de *Dendrobium* e de *Brassolaeliocattleya*, por exemplo, perderam completamente a viabilidade, após apenas três meses em temperatura ambiente (Kano, 1965).

Com a redução do teor de água inicial, foi possível obter um aumento na longevidade das sementes de orquídeas, embora fossem ainda armazenadas em temperatura ambiente. Desse modo, sementes de *Brassolaeliocattleya* e de *Dendrobium*, após a redução do teor de água, mantiveram, respectivamente, 70 e 7 % de sua viabilidade inicial, após 17 meses de armazenamento em temperatura ambiente (Kano, 1965). Entretanto, sementes de *Cattleya aurantiaca* perderam quase que completamente a viabilidade, após um ano de armazenamento e com teores de água entre 2,2 e 5,6 % e a 20 °C (Seaton, 1985); e sementes desidratadas de *Dendrobium phalaenopsis* e de *Phalaenopsis amabilis* perderam 30 % da viabilidade, após apenas 20 dias a 25-28 °C (Limartha, 1975). Sementes de *Dactylorhiza fuchsii*, mantidas à temperatura de 62 °C, perderam completamente a viabilidade, em poucos dias (Pritchard, 1985a).

Um aumento significativo na longevidade das sementes de orquídeas só foi obtido, após a redução concomitante da temperatura e do teor de água, com o armazenamento das sementes em geladeira. Pequena redução na viabilidade foi verificada em sementes de *Eulophia alta* (Pritchard, 1985b) e de *Dactylorhiza maculata* (Dijk, 1987, citado por Pritchard & Seaton, 1993), após dois a seis meses nessas condições. Sementes de *Cattleya aurantiaca*

com teores de água de 6,5 e 10,4 % perderam, respectivamente, apenas 33 e 37 % da viabilidade, após seis anos de armazenamento a 5 °C (Seaton & Hailes, 1989).

Os maiores avanços no aumento da longevidade de sementes de orquídeas foram obtidos com o armazenamento em ambientes com baixa temperatura e baixa umidade relativa. Knudson (1940, 1953), trabalhando com híbridos de *Cattleya* e com algumas outras espécies, demonstrou, pela primeira vez, ser possível preservar sementes de orquídeas, por prolongados períodos de tempo, reduzindo a umidade e a temperatura. As sementes testadas apresentaram, ainda, diferentes graus de viabilidade, mesmo após 22 anos de armazenamento a 8 °C, na presença de cloreto de cálcio anidro. Uma falha comum nos trabalhos é a não determinação da viabilidade inicial das sementes, o que impede a determinação da taxa de perda da viabilidade.

Embora o armazenamento de sementes de orquídeas a baixas temperaturas e umidade relativa seja considerado um método satisfatório, estudos envolvendo a longevidade e o teor de água das sementes quase não são relatados (Pritchard & Seaton, 1993).

A sobrevivência de sementes de orquídeas, quando congeladas, foi demonstrada, primeiramente, em um híbrido de *Cattleya* (Svihla & Ostermam, 1943). Sementes de *Encyclia vitellinum*, armazenadas por cinco semanas a -40 °C, não apresentaram perda na viabilidade (Koopowitz & Ward, 1984). Sementes de 29 espécies de orquídeas, abrangendo 20 diferentes gêneros, foram capazes de tolerar o armazenamento em temperaturas de -10 °C, durante dois a sete meses, mostrando, entretanto, graus diferenciados de viabilidade (Bowling & Thompson, 1972). Sementes de *Calanthe discolor* x *Calanthe sieboldii* e de *Calanthe discolor* armazenadas, por um ano, a -15 e -17 °C, respectivamente, perderam 52 % e 30 % da viabilidade (Hasegawa *et al.*, 1978). Esses resultados forneceram os primeiros indícios de que sementes desidratadas de algumas espécies de orquídeas possuem uma baixa longevidade, quando armazenadas nas temperaturas normalmente utilizadas nos bancos de germoplasma de sementes (-18 a -20 °C). Comprovando essa hipótese, vários lotes de

sementes de orquídeas, armazenadas a  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ , perderam completamente a viabilidade, após oito anos (Pritchard, 1986). Outros resultados mostram que sementes armazenadas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , durante um ano, apresentam respostas variáveis para viabilidade, dependendo da espécie (Pritchard & Seaton, 1993). Por outro lado, em temperaturas ultra-baixas, os resultados são bem mais promissores. Por exemplo, sementes de três híbridos de *Cattleya* e de *Dendrobium nobile* desidratadas ou imersas em glicerina, germinaram muito bem, após 209 e 465 dias de armazenamento a  $-79\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Ito, 1965) e dez diferentes espécies de orquídeas mantiveram a viabilidade inicial após imersão em NL (Pritchard, 1984).

À luz do atual conhecimento e baseando-se em trabalhos envolvendo pequeno número de espécies, ainda não é possível determinar um método eficiente para armazenamento de sementes de orquídeas por longos períodos de tempo. Muitos outros estudos, envolvendo diferentes formas de armazenamento e distintas espécies, devem ser ainda desenvolvidos. Os resultados obtidos com *C. aurantiaca* e outras orquídeas de regiões tropicais sugerem que o armazenamento dessas espécies, utilizando o método convencional (5 % de umidade e  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), não constitui adequada alternativa. Até o momento, também não foi possível relacionar, claramente, a longevidade das sementes com a temperatura de armazenamento e com o teor de água das sementes (Pritchard & Seaton, 1993).

É possível que aumentos significativos na longevidade das sementes de orquídeas possam ser obtidos em temperaturas ultra-baixas, em NL (Pritchard, 1984), uma vez que todos os processos bioquímicos são virtualmente paralisados. A perda de viabilidade das sementes de *Dactylorhiza fuchsii* é menor a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  do que a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Pritchard & Seaton, 1993). Entretanto existem poucos trabalhos envolvendo o emprego de ultra-baixas temperaturas na conservação de sementes de orquídeas. A criopreservação deve ser o método utilizado para a conservação de sementes de orquídeas em bancos de germoplasma. Entretanto, a eficiência desse método de conservação, por longos períodos de tempo, ainda necessita de melhor investigação, antes da implantação dos bancos de germoplasma (Seaton 1994; Pritchard *et al.*, 1999).

A conservação de germoplasma de orquídeas, por meio da criação de bancos de germoplasma de sementes, é perfeitamente viável. E novos estudos devem ser conduzidos no sentido de se definir melhores formas de armazenamento das sementes de plantas desta família (Pritchard *et al.*, 1999).

## **2.2. Conservação de sementes de orquídeas**

Devido ao diminuto tamanho e ao grande número de sementes produzidas em uma única cápsula, podendo ultrapassar um milhão, as sementes de orquídeas podem ser armazenadas ocupando muito pouco espaço. Entretanto, estas sementes possuem uma longevidade baixa, se armazenadas em temperatura ambiente, podendo perder a viabilidade rapidamente, especialmente em regiões quentes e úmidas (Borromeo, 1974).

Apesar do pequeno número de espécies estudadas até o momento, as sementes de orquídeas são classificadas como ortodoxas. Ainda que alguns pesquisadores tenham demonstrado que sementes de várias espécies de orquídeas mantêm a viabilidade quando armazenadas pelos procedimentos convencionais, a longevidade e os resultados obtidos são bastante variáveis. Assim sendo, o armazenamento de sementes de orquídeas pelo método tradicional (-18 °C e 5 % de umidade) parece não ser o mais indicado para a conservação destas, por longos períodos de tempo, em bancos de germoplasma (Pritchard & Seaton, 1993).

Bowling & Thompson (1972) armazenaram sementes de 30 diferentes espécies de orquídeas a -10 °C. Embora essas sementes permanecessem viáveis durante três anos, uma análise após 10 anos de armazenamento, revelou que todas as sementes estavam mortas (Pritchard, 1986). Seaton & Hailes (1989) verificaram a perda quase total da viabilidade em um lote de sementes de *Cattleya aurantiaca*, armazenadas durante 50 dias a -18 °C, enquanto que em outro lote, dessa mesma espécie, as sementes armazenadas, durante 400 dias, nas mesmas condições do lote anterior, apresentaram alta viabilidade (Thornhill & Koopowitz, 1992). Diversos

trabalhos vêm sendo desenvolvidos ao longo dos últimos anos, no sentido de se determinar quais as melhores condições de armazenamento de sementes de orquídeas. Os resultados são muito variáveis, dependendo do método empregado, da espécie e, até mesmo, do lote de sementes testado. Com base nos trabalhos revisados, pode-se verificar que essa é uma área relativamente nova e em pleno desenvolvimento, o que, segundo Seaton & Pritchard (1999) gera bastante discussão e requer ainda muita pesquisa.

Embora classificadas como ortodoxas, as sementes de orquídeas perdem a viabilidade, quando armazenadas na presença de dessecantes em determinadas condições. Para sementes ortodoxas, normalmente, espera-se um aumento na longevidade das sementes com a redução do teor de água e ação de agentes dessecantes, os quais auxiliam na redução dessa umidade. Entretanto, em *Disa uniflora*, a manutenção das sementes em contato com o agente dessecante parece ter desidratado em excesso as sementes, levando à perda da viabilidade das mesmas. Dessa maneira, os limites mínimos para o teor de água das sementes de orquídeas necessitam de melhor definição (Thornhill & Koopowitz, 1992).

Para cada temperatura de armazenamento, é possível calcular o tempo para que a viabilidade das sementes caia para 50 % (Roberts, 1973), denominado  $P_{50}$ . Para cada grau de redução na temperatura, há um aumento exponencial no  $P_{50}$ . Assim, para sementes de orquídeas, até que seja possível compreender toda a cinética envolvida na sua longevidade, ao serem armazenadas com o objetivo de conservação de germoplasma, devem ser mantidas em temperaturas iguais ou inferiores a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Thornhill & Koopowitz, 1992).

Como já mencionado antes, o método mais estudado, atualmente, para a preservação de material vegetal por longos períodos de tempo é a criopreservação. Mello (2000), estudando o comportamento de sementes de orquídeas nativas do cerrado brasileiro, quando armazenadas em NL, verificou que a criopreservação pode ser utilizada, como forma de manutenção da viabilidade das sementes e, conseqüentemente, como forma de conservação destes propágulos das orquidáceas.

Qualquer parte da planta pode ser potencialmente criopreservada. A escolha do propágulo a ser criopreservado vai depender das características da planta e de sua importância na preservação do genótipo da variedade ou espécie. A criopreservação de sementes e pólen tende a ser mais simples e mais eficaz do que a de outras partes da planta e, dessa maneira, foram as formas escolhidas para o desenvolvimento deste trabalho. Há que se mencionar, no entanto, que a criopreservação é apenas uma das maneiras de se conservar germoplasma. Um sistema de conservação de germoplasma deve, de preferência, contemplar mais de um tipo de propágulo e, ou, método de armazenamento (Towill, 2002).

Até o momento, poucos trabalhos têm sido conduzidos utilizando-se a criopreservação em orquídeas. Pritchard (1984) foi quem primeiro se preocupou em criopreservar sementes de orquídeas, verificando que sementes de dez diferentes espécies resistiram, satisfatoriamente, ao processo de criopreservação, mantendo a viabilidade inicial, após o processo. Após esse trabalho, passou-se mais de uma década, antes que outros trabalhos, utilizando a criopreservação em orquídeas, fossem publicados.

Os avanços obtidos na criopreservação de plantas com a publicação dos trabalhos de Sakai e de sua equipe, no início da década de noventa, talvez, justifiquem o ressurgimento de trabalhos nessa área, para as plantas da família Orchidaceae. Como exemplos, Ishikawa *et al.* (1997), usando o método da vitrificação, criopreservaram embriões zigóticos de *Bletilla striata* e Tsukasaki *et al.* (2000) criopreservaram calos obtidos a partir de ápices meristemáticos de *Doritaenopsis*. Alguns trabalhos envolvendo a criopreservação de sementes de orquídeas foram também desenvolvidos. Sementes desidratadas de *Dendrobium candidum* (Wang *et al.*, 1998) e de *Bratonia* (Popova *et al.*, 2003), colocadas diretamente em NL, apresentaram altas porcentagens de germinação.

Poucos trabalhos testaram o método da vitrificação na criopreservação de sementes de orquídeas. Thammasiri (2000) criopreservou sementes de *Doritis pulcherrima*, usando a vitrificação. As sementes foram deixadas por 50 minutos em contato com o PVS2, em

temperatura ambiente e, em seguida, foram transferidas para o NL. A germinação obtida foi de 62 %, ao passo que as sementes colocadas diretamente no NL sem a desidratação prévia na solução de PVS2, não germinaram. Em recente trabalho, Hirano *et al.* (2005) trabalharam com sementes imaturas de *Bletilla striata*. As sementes, com idades variando de dois a seis meses, foram deixadas por 2 horas em solução de PVS2 a 0 °C. As maiores porcentagens de germinação foram obtidas com sementes de quatro meses de idade. Quando essas sementes foram vitrificadas, a porcentagem de germinação foi de 78 %, enquanto que, quando colocadas diretamente em NL, somente 32 % germinaram.

### **2.3. Conservação de pólen de orquídeas**

Estudos sobre o armazenamento de pólen de orquídeas são muito escassos e, conseqüentemente, há muito pouca informação disponível. O armazenamento de pólen de orquídeas tende a ser semelhante ao das sementes. Pritchard & Prendergast (1989) examinaram o pólen de várias orquídeas terrestres e concluíram que, para as espécies estudadas, desidratando as políneas em sílica-gel, havia queda na viabilidade das mesmas, comprovando o trabalho feito com pólen de *Dendrobium* e *Oncidium* por Meeyot & Kamemoto (1969). Seaton & Hailes (1989) também observaram a redução da viabilidade, quando o pólen de *Cattleya aurantiaca* foi armazenado em sílica-gel. A perda da viabilidade pode ser devido à desidratação excessiva. Com base na literatura revisada, não há trabalhos envolvendo a conservação de pólen de orquídeas em ultra-baixas temperaturas. Seaton & Pritchard (1999) recomendam que a criopreservação em NL seja utilizada na formação dos bancos de germoplasma de pólen e sementes de orquídeas, embora ressaltando a importância de se comprovar, ainda, a eficácia desse método.

Os métodos aplicados para sementes devem, também, ser testados no armazenamento de pólen. Até o presente momento, o pólen de orquídeas tem sido armazenado por curtos períodos de tempo, geralmente não superiores a um ano, em geladeira (4 °C) ou em freezer (-4 °C) (Seaton,

1994). Nenhum trabalho foi encontrado envolvendo a conservação de pólen de orquídeas, por longos períodos de tempo, visando à formação de bancos de germoplasma.

## **OBJETIVOS**

Este trabalho teve como objetivo geral desenvolver protocolos visando à conservação de sementes e pólen de orquídeas, por longos períodos de tempo, a ultra-baixas temperaturas, em nitrogênio líquido.

Objetivos específicos:

- Verificar a eficiência do método da vitrificação na criopreservação de sementes e pólen de orquídeas;
- Definir a melhor temperatura e tempo de exposição das sementes e das políneas à solução de vitrificação (PVS2).

**CRIOPRESERVAÇÃO DE SEMENTES DE  
*DENDROBIUM***

**CAPÍTULO 1**

## RESUMO

O armazenamento de sementes tem sido uma preocupação crescente nos programas de melhoramento genético de plantas e tem também grande importância como forma de preservação do material genético. Um método simples para criopreservação de sementes maduras de diferentes cultivares do gênero *Dendrobium* foi testado. Para a cultivar *D. Jaquelyn Thomas*, o método de vitrificação incluiu a exposição das sementes à solução de vitrificação (PVS2), em temperatura ambiente ou em banho de gelo, por um período de 1, 2, 3, 4 ou 5 horas. Em seguida, as sementes foram colocadas em nitrogênio líquido (NL), durante 14 dias. Após esse período, foram descongeladas e colocadas para germinar em meio MS, contendo metade da concentração dos sais, acrescido de  $58,5 \text{ mol L}^{-1}$  de sacarose e solidificado com 0,6 % de ágar, depois de ajustado o pH para  $5,7 \pm 0,1$ . A porcentagem de germinação foi determinada após oito semanas de cultivo nesse meio. Para essa cultivar, a maior porcentagem de germinação foi obtida quando as sementes foram deixadas durante uma hora em PVS2 em banho de gelo. Para as demais cultivares, *Dendrobium Sena Red*; *Dendrobium BFC Pink* e *Dendrobium Mini W/RL*, não houve diferença entre os tratamentos em que as sementes permaneceram de uma a três horas em PVS2 em banho de gelo. O tratamento de vitrificação foi essencial para a sobrevivência das sementes após a criopreservação. As sementes que germinaram desenvolveram plantas normais após a vitrificação. O método da vitrificação pode ser usado na criopreservação das cultivares de *Dendrobium* utilizadas neste experimento e deve ser testado na criopreservação de sementes de outras orquídeas.

**Palavras-chave:** Vitrificação; Orquídeas; Orchidaceae; Banco de germoplasma.

## INTRODUÇÃO

A criopreservação constitui eficiente método de conservação de germoplasma de plantas, animais e microrganismos, por longos períodos de tempo e envolve a conservação do material biológico em temperaturas ultra-baixas, em nitrogênio líquido (NL) (Engelmann, 1997). Uma etapa muito importante do processo de criopreservação é a desidratação das células. A redução da água livre no interior das células evita os danos físicos causados pelos cristais de gelo, formados durante o congelamento. Os tratamentos realizados antes da criopreservação, utilizando crioprotetores, têm se mostrado essenciais para o êxito do método e para a sobrevivência do material biológico, após o descongelamento (Panis & Thinh 2001).

O método da vitrificação foi desenvolvido por Fahy *et al.* (1984) trabalhando com rins de coelhos e tem sido largamente aplicado na criopreservação de diferentes materiais biológicos. O uso da vitrificação em plantas teve início na década de noventa com os trabalhos publicados por Sakai *et al.* (1990), Sakai *et al.* (1991a), Sakai *et al.* (1991b), Yamada *et al.* (1991) e Nishikawa *et al.* (1993). A vitrificação pode ser definida como a passagem da água diretamente da fase líquida, para uma fase amorfa ou vítrea, evitando a formação de cristais de gelo (Fahy *et al.*, 1984). O método da vitrificação consiste em se usar soluções crioprotetoras altamente concentradas, chamadas de solução de vitrificação, com o objetivo de promover a desidratação do material biológico, de modo a prepará-lo para sua imersão no NL (Sakai *et al.*, 1990). O uso da solução de vitrificação elimina a necessidade do congelamento lento do material, como é utilizado no método clássico de criopreservação. Isto porque a desidratação ocorre antes do congelamento e não durante. Ao reduzir o teor de água livre, a solução de vitrificação reduz ou elimina as injúrias causadas pelo frio. No método da vitrificação, a temperatura e o tempo de permanência do material em contato com a solução de vitrificação devem ser monitorados para que se evitem injúrias causadas por toxicidade química ou por excesso de

desidratação (Thammasiri, 2000). Esse processo é muito simples e muito eficaz por dispensar o controle da taxa de congelamento, permitindo que o material seja diretamente transferido para o NL.

A vitrificação é um método simples, seguro, de menor custo e tem sido utilizada na criopreservação de diversos materiais vegetais (Sakai *et al.*, 1990; Sakai *et al.*, 1991a; Sakai *et al.*, 1991b; Yamada *et al.*, 1991; Nishizawa *et al.*, 1993; Santos, 2001).

Até o momento, existem poucos trabalhos utilizando a criopreservação, como forma de conservação de germoplasma de orquídeas (Pritchard, 1984; Ishikawa *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1998; Thammasiri, 2000; Tsukasaki *et al.*, 2000; Popova *et al.*, 2003; Hirano *et al.*, 2005). A vitrificação foi utilizada na criopreservação de protocórmios e embriões zigóticos (Ishikawa *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1998), em sementes (Thammasiri, 2000; Hirano *et al.*, 2005) e em suspensões celulares de orquídeas (Tsukasaki *et al.*, 2000). O uso de pouco espaço e o menor custo de manutenção faz da criopreservação um método com grande potencial para ser utilizado na conservação de sementes de orquídeas (Thammasiri, 2000). Estudos envolvendo o uso da criopreservação em sementes de orquídeas já foram descritos para algumas espécies (Pritchard, 1984; Wang *et al.*, 1998; Thammasiri, 2000; Popova, 2003; Hirano, 2005), embora apenas dois trabalhos utilizem o método da vitrificação (Thammasiri, 2000; Hirano, 2005).

Por ser um método prático, simples, rápido e de custo, relativamente, baixo, a criopreservação torna-se apropriada para a conservação de sementes de orquídeas. Além disso, apresenta grande potencial de uso na formação de bancos de germoplasma de orquídeas, por conservar o material por longos períodos de tempo. Contudo, são poucos os trabalhos realizados sobre o uso da vitrificação na criopreservação de sementes de orquídeas. Desse modo, o principal objetivo deste trabalho, foi ajustar um método de vitrificação eficiente e viável para a criopreservação de sementes maduras de algumas cultivares do gênero *Dendrobium*.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os trabalhos foram conduzidos no Laboratório de Horticultura Ornamental do Tropical Research and Education Center, na Universidade da Flórida, em Homestead, Flórida. Foram desenvolvidos dois experimentos envolvendo criopreservação de sementes de orquídeas.

### 1. Criopreservação de sementes de *Dendrobium* Jaquelyn Thomas

#### 1.1. Material

Duas cápsulas, obtidas por autofecundação e contendo sementes maduras de *Dendrobium* 'Jaquelyn Thomas', foram fornecidas por Lisa Smith, Ellenton Growers, Palmetto, Flórida, EUA. As cápsulas foram coletadas no outono de 2004 e armazenadas em dessecador, contendo sílica-gel, à temperatura ambiente ( $27 \pm 2$  °C), durante 24 horas. O tamanho das cápsulas foi medido utilizando-se um paquímetro (Control Company, Friendswood, TX, EUA). As sementes foram retiradas das cápsulas e o tamanho das mesmas foi medido usando uma lupa Leica MZ12.5 com escala micrométrica (Leica Microsystems, Buffalo, NY, EUA). As sementes foram pesadas e três amostras foram colocadas em uma estufa a 103 °C por 17 horas e, em seguida, o teor de água foi determinado (International Seed Testing Association, 1993).

#### 1.2. Desinfestação e preparação das sementes

Foram pesadas 250 mg de sementes e estas foram transferidas para uma seringa de 100 mL. Foram adicionados 50 mL de etanol 70 % (v/v) e a seringa foi agitada durante um minuto. Em seguida, o etanol foi eliminado da seringa usando-se uma agulha de ponta fina. Foram adicionados 50 mL de uma solução de Clorox<sup>®</sup> 10 % (v/v) (hipoclorito de sódio 0,6 %) e a seringa

foi agitada durante 20 minutos. Foram feitas duas enxaguaduras com água desionizada estéril. Em seguida, as sementes em solução aquosa foram transferidas para um frasco e o volume foi completado para 150 mL. Um mililitro da suspensão, contendo as sementes, foi distribuído em cada tubo de criopreservação (criotubo), com capacidade para 2 mL. As sementes nos criotubos foram deixadas em repouso por uma noite, em temperatura ambiente ( $27 \pm 2$  °C). Cada mililitro dessa suspensão no criotubo continha ao redor de 1000 sementes.

### 1.3. Tratamentos

Removeu-se 1 mL da água desionizada estéril, deixando-se apenas as sementes decantadas no fundo de cada tubo de criopreservação. Em seguida, 1 mL da solução crioprotetora, composta de glicerol a  $2 \text{ mol L}^{-1}$  e sacarose a  $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ , foi adicionado em cada criotubo independente do tratamento. As sementes foram deixadas em contato com essa solução durante 30 minutos, à temperatura ambiente ( $27 \pm 2$  °C), antes da adição da solução de vitrificação. Essa solução, denominada PVS2 (Sakai *et al.*, 1990), foi composta de 30 % (v/v) de glicerol, 15 % (v/v) de etileno glicol, 15 % (v/v) de dimetil sulfóxido (DMSO) e  $0,4 \text{ mol L}^{-1}$  de sacarose, em meio contendo metade da concentração dos sais de MS (Murashige & Skoog, 1962). O pH foi ajustado para  $5,7 \pm 0,1$ . A solução PVS2 é altamente concentrada, evitando a formação de cristais de gelo, durante o congelamento e descongelamento das sementes (Sakai *et al.*, 1990).

Os tratamentos consistiram em deixar as sementes em contato com a solução PVS2, em temperatura ambiente ( $27 \pm 2$  °C) ou em banho de gelo (0 °C), durante 1, 2, 3, 4, ou 5 horas antes da imersão em NL. Os controles consistiram em se colocar as sementes para germinar, em meio contendo sais de MS em metade da concentração original, sem tratamento de vitrificação, e sem imersão em NL (Controle 1). No Controle 2, as sementes foram deixadas em PVS2, durante 3 h, porém sem imersão no NL. No Controle 3, as sementes foram colocadas em PVS2 e, imediatamente, transferidas para o NL; e, finalmente, no Controle 4, as sementes foram

colocadas diretamente no NL, sem tratamento de vitrificação. As sementes permaneceram no NL, durante 14 dias.

Após 14 dias, os criotubos foram retirados do NL e descongelados à temperatura ambiente, o que ocorreu em um tempo de aproximadamente 30 min. Em seguida, a solução PVS2 foi removida de cada criotubo, utilizando-se uma pipeta automática. Um mililitro de meio, contendo metade da concentração dos sais de MS e sacarose a  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$  (pH  $5,7 \pm 0,1$ ) foi adicionado em cada um dos criotubos, e deixado em contato com as sementes, durante 1 h. Em seguida, as sementes foram enxaguadas por duas vezes no mesmo meio descrito anteriormente (MS modificado), exceto a sacarose, cuja concentração foi de  $58,5 \text{ mmol L}^{-1}$ . As sementes foram, então, colocadas para germinar em placas de Petri, contendo o meio descrito acima para enxaguadura destes propágulos, porém solidificado com 0,6 % (p/v) de ágar (Fisher®). As placas de Petri, envoltas em Parafilm®, foram incubadas em sala de cultivo apresentando temperatura de  $27 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ ; fotoperíodo de 18:6h luz:escuro e irradiância de  $60 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , fornecida por tubos fluorescentes Philips® com potência de 40 Watt e luz branca. As placas de Petri foram monitoradas uma vez por semana. A porcentagem de germinação foi determinada oito semanas após o plaqueamento, para todos os controles e tratamentos, por meio da contagem do número de sementes germinadas, utilizando-se lupa Leica MZ12.5 (Leica Microsystems, Buffalo, NY, EUA).

#### **1.4. Delineamento experimental e análises estatísticas**

O experimento foi montado segundo um esquema fatorial  $5 \times 2$  (5 períodos de incubação das sementes em PVS2 e duas temperaturas) para os tratamentos e mais quatro controles, no delineamento inteiramente casualizado, com 10 repetições. Cada repetição consistiu de um criotubo, contendo ao redor de 1000 sementes. Os dados de germinação foram analisados utilizando-se estatística descritiva.

## **2. Criopreservação de sementes de *Dendrobium* Sena Red Thailand, *Dendrobium* BFC Pink e de *Dendrobium* Mini W/RL**

### **2.1. Material**

Com base nos resultados alcançados no primeiro experimento, um novo experimento, utilizando três diferentes cultivares do gênero *Dendrobium*, foi desenvolvido. Quinze cápsulas de *Dendrobium* Sena Red Thailand, dezesseis de *Dendrobium* BFC Pink e oito de *Dendrobium* Mini W/RL, todas obtidas por autofecundação, foram coletadas seis meses após a polinização. As plantas foram fornecidas por Ty Wilson, Kerry's Bromeliad Nursery, Inc., Homestead, Florida, EUA. As cápsulas foram coletadas no final do inverno de 2005 e armazenadas em dessecador, contendo sílica-gel, à temperatura ambiente ( $27 \pm 2$  °C), durante 24 h. As características, como tamanho das cápsulas e das sementes, peso e teor de água das sementes, foram determinadas utilizando-se os mesmos procedimentos do experimento anterior.

### **2.2. Desinfestação e preparação das sementes**

As sementes foram desinfestadas seguindo o mesmo método do experimento anterior.

Um mililitro da suspensão contendo as sementes foi transferido para cada criotubo, com capacidade para 2 mL. Essas sementes foram deixadas em repouso durante uma noite, em condições de temperatura ambiente ( $27 \pm 2$  °C). Cada mililitro dessa suspensão continha ao redor de 1000 sementes.

### **2.3. Tratamentos**

Removeu-se 1 mL da água desionizada estéril, deixando-se apenas as sementes decantadas no fundo de cada tubo de criopreservação. Em seguida, um mililitro da solução crioprotetora (glicerol a  $2 \text{ mol L}^{-1}$ , sacarose a

0,4 mol L<sup>-1</sup> e pH ajustado para 5,7 ± 0,1) foi adicionado em cada criotubo, independente do tratamento. As sementes foram deixadas em contato com a referida solução, por 30 minutos, à temperatura ambiente (27 ± 2 °C) e antes da adição da solução de vitrificação (PVS2).

Tendo como base os resultados obtidos no experimento anterior, com *Dendrobium* Jaquelyn Thomas, os tratamentos consistiram em colocar as sementes na solução PVS2 em banho de gelo (0 °C), durante 1, 2 ou 3 h antes da imersão em NL. Os controles consistiram em colocar as sementes para germinar em meio contendo os sais de MS, à metade da concentração original, sem tratamento de vitrificação, e sem imersão em NL (Controle 1). No Controle 2, as sementes foram deixadas em PVS2 durante 3 h, porém sem imergi-las em NL. No Controle 3, as sementes foram colocadas em PVS2 e imediatamente transferidas para o NL. As sementes permaneceram no NL, durante 3 dias.

Após 3 dias, os criotubos foram retirados do NL e descongelados à temperatura ambiente, o que ocorreu em um tempo de aproximadamente 30 minutos. Em seguida, a solução PVS2 foi removida de cada criotubo, utilizando-se uma pipeta automática. Um mililitro de meio, contendo metade da concentração dos sais de MS, e 1,0 mol L<sup>-1</sup> de sacarose (pH 5,7 ± 0,1) foi adicionado em cada um dos criotubos, e deixado em contato com as sementes, durante uma hora. Após esse tempo, as sementes foram enxaguadas por duas vezes, no meio, anteriormente descrito (MS modificado), exceto a sacarose, cuja concentração foi de 58,5 mmol L<sup>-1</sup>. As sementes foram, então, colocadas para germinar em placas de Petri, contendo o meio descrito acima para enxaguadura destes propágulos, porém solidificado com 0,6 % (p/v) de ágar (Fisher®). As placas de Petri, envoltas em Parafilm®, foram incubadas em sala de cultivo apresentando temperatura de 27 ± 2 °C; fotoperíodo de 18:6h luz:escuro e irradiância de 60 mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, fornecida por tubos fluorescentes Philips® com potência de 40 Watt e luz branca. As placas de Petri foram monitoradas uma vez por semana. A porcentagem de germinação foi determinada oito semanas, após o plaqueamento, para todos os controles e tratamentos, mediante contagem

do número de sementes germinadas, utilizando-se lupa Leica MZ12.5 (Leica Microsystems, Buffalo, NY, EUA).

#### **2.4. Delineamento experimental e análises estatísticas**

O experimento foi montado segundo um esquema fatorial 3 x 1 (3 períodos de incubação das sementes em PVS2 e uma temperatura) para os tratamentos e mais três controles, no delineamento inteiramente casualizado, com 10 repetições. Cada repetição consistiu de um criotubo, contendo ao redor de 1000 sementes. Os dados de germinação foram analisados utilizando-se estatística descritiva.

# RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 1. Criopreservação de sementes de *Dendrobium* Jaquelyn Thomas

As sementes, quando observadas em lupa, continham embriões bem formados e possuíam, em média, 0,6 mm de comprimento e 0,08 mm de largura. O teor de água inicial foi de 9 % (Tabela 1).

**Tabela 1.** Características das sementes maduras de *Dendrobium* Jaquelyn Thomas, após 24 h em dessecador contendo sílica-gel.

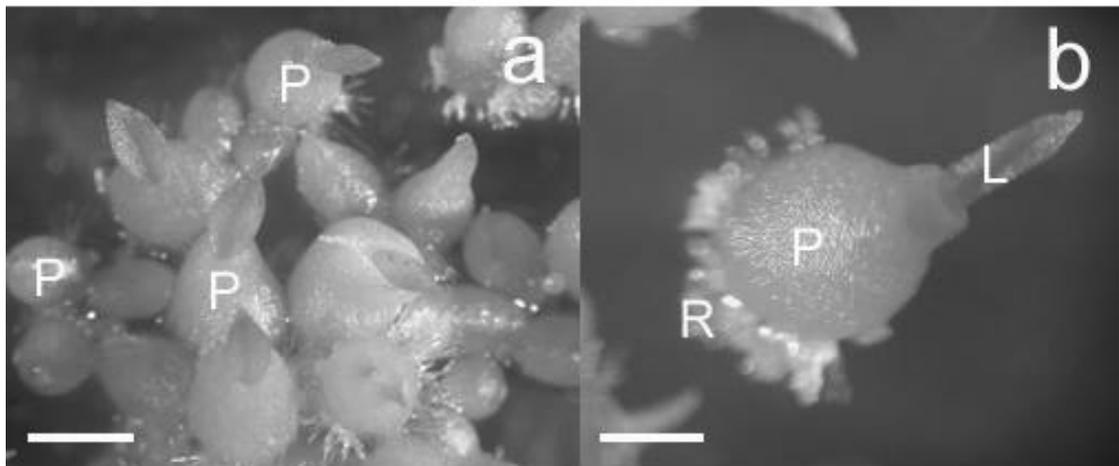
---

Característica	
Tamanho da cápsula* <sup>1</sup> (comprimento x largura cm)	3,41 x 1,54
Massa da cápsula* <sup>1</sup> (g)	7,75
Tamanho da semente* <sup>2</sup> (comprimento x largura mm)	0,60 x 0,08
Massa de 100 sementes* <sup>3</sup> (mg)	0,2
Teor de água* <sup>3</sup> (% massa fresca)	9

---

\*<sup>1</sup> Média de 2 cápsulas; \*<sup>2</sup> média de 50 sementes; \*<sup>3</sup> média de três repetições.

A germinação foi avaliada com base no intumescimento das sementes e formação dos protocórmios (Figura 1a). Os protocórmios desenvolveram primórdios foliares e rizóides (Figura 1b).



**Figura 1.** Germinação das sementes de *Dendrobium* Jaquelyn Thomas. **a.** Germinação das sementes, mostrando os protocórmios (**P**), em diferentes estádios de desenvolvimento. *Barra:* 1,0 mm. **b.** Detalhe de um protocórmio (**P**), mostrando os primórdios foliares (**L**) e os rizóides (**R**). *Barra:* 0,4 mm.

As sementes mantidas em temperatura ambiente e germinadas em meio MS, sem exposição ao PVS2 e sem imersão no NL (Controle 1) apresentaram a maior porcentagem de germinação (95,65 %) (Tabela 2). As sementes expostas ao PVS2 durante 3 h em banho de gelo e sem imersão em NL (Controle 2) sofreram redução em sua porcentagem de germinação (13 % menor que no Controle 1). Por outro lado, as sementes, mantidas em temperatura ambiente sem exposição ao PVS2, ou expostas ao PVS2 no tempo zero, e, em seguida, imersas em NL (Controles 4 e 3) não germinaram. Verificou-se, ainda, que houve diminuição na porcentagem de sementes germinadas, em todos os tratamentos, à medida que aumentava o tempo de exposição ao PVS2. Nos tratamentos em que as sementes permaneceram no PVS2 em banho de gelo, a germinação foi maior, quando comparados aos tratamentos em que as sementes ficaram no PVS2 em temperatura ambiente. A maior porcentagem de germinação (21,76 %), entre os tratamentos, foi observada nas sementes expostas ao PVS2, em banho de gelo, durante 1 h, antes da criopreservação; e foi superior a todos os demais tratamentos. A menor porcentagem de germinação, obtida nos tratamentos em banho de gelo (1,64 %), foi observada nas sementes

expostas ao PVS2, durante 5 h. Os tratamentos que envolveram o emprego de diferentes tempos no PVS2, em temperatura ambiente, mostraram porcentagem de germinação que variaram de zero a 3,79 % e foram inferiores às dos tratamentos em banho de gelo.

**Tabela 2.** Germinação de sementes de *Dendrobium* Jaquelyn Thomas aos dois meses após a retirada do nitrogênio líquido (NL). C1: sem PVS2 e sem NL; C2: 3 h PVS2 e sem NL; C3: 0 h PVS2 e no NL; C4: sem PVS2 e no NL; T1 – T5 = tratamentos PVS2 em temperatura ambiente por 1, 2, 3, 4 ou 5 h; T6 – T10 = tratamentos PVS2 em banho de gelo por 1, 2, 3, 4 ou 5 h.

Controle (C) Tratamento (T)	Temperatura	PVS2 (h)	NL <sup>w</sup>	Germinação (%)
C1	TA <sup>z</sup>	Sem PVS2	-	95,65 ± 0,70
C2	BG <sup>y</sup>	3	-	82,85 ± 7,26
C3	TA	0	+	0,00 ± 0,00
C4	TA	Sem PVS2	+	0,00 ± 0,00
T1	TA	1	+	3,79 ± 4,64
T2	TA	2	+	0,21 ± 0,32
T3	TA	3	+	0,08 ± 0,16
T4	TA	4	+	0,00 ± 0,00
T5	TA	5	+	0,00 ± 0,00
T6	BG	1	+	21,76 ± 8,47
T7	BG	2	+	12,57 ± 3,42
T8	BG	3	+	8,40 ± 7,73
T9	BG	4	+	3,72 ± 3,88
T10	BG	5	+	1,64 ± 0,98

<sup>z</sup>TA = Temperatura ambiente (27 ± 2 °C); <sup>y</sup>BG = Banho de gelo (0 °C);

<sup>w</sup>‘-’ = sem imersão em NL; ‘+’ = com imersão em NL.

Controles = C1 – C4. Tratamentos = T1 – T10;

Embora, na maioria dos trabalhos, o material seja desidratado pela solução de vitrificação em banho de gelo, Thammasiri (2000), trabalhando

com *Doritis pulcherrima* obteve alta porcentagem de germinação (62 %), quando as sementes permaneceram 50 min em contato com PVS2 à temperatura ambiente. Neste trabalho, no entanto, os melhores resultados foram obtidos quando as sementes permaneceram em contato com a solução PVS2 em banho de gelo.

Em estudos preliminares com *Encyclia alata* (dados não publicados), as maiores porcentagens de germinação (80 %) foram obtidas, depois que as sementes permaneceram em contato com PVS2, durante 3 h, em banho de gelo. Resultados semelhantes foram relatados em embriões zigóticos de *Bletilla striata* (Ishikawa *et al.*, 1997), embora, em ambos os trabalhos, o teor de água inicial não tenha sido determinado. Apesar de o teor de água inicial das sementes, neste trabalho, ser de 9 %, nenhuma semente germinou quando colocada diretamente em NL, sendo necessária a desidratação das mesmas pela solução de vitrificação (Tabela 2). Sementes de *Doritis pulcherrima*, com 31 % de umidade inicial, quando colocadas diretamente em NL também não germinaram (Thammasiri, 2000).

Wang *et al.* (1998) criopreservaram com êxito sementes de *Dendrobium candidum*, colocadas diretamente em NL. O teor de água ótimo foi de 12 a 19 % com porcentagem de sobrevivência de 88 %. Por outro lado, os resultados deste trabalho indicam que, mesmo em teor de água de 9 %, as sementes de *Dendrobium* Jaquelyn Thomas não sobrevivem, quando colocadas diretamente em NL, sem tratamento prévio. Diferenças genotípicas podem ter contribuído para as diferenças obtidas nesses trabalhos. De fato, o efeito do tempo de exposição ao PVS2 tem sido reportado como sendo específico para cada espécie vegetal (Bajaj, 1995) e variações interespecíficas também influenciam na longevidade das sementes de orquídeas (Pritchard *et al.*, 1999).

A desidratação do material é uma das etapas mais importantes na criopreservação e é crítica para sua sobrevivência, permitindo a redução do teor de água nas células e, assim, evitando os danos físicos, causados pela formação dos cristais de gelo, durante o congelamento (Sakai *et al.*, 1991a). Os tratamentos realizados antes da criopreservação têm se mostrado essenciais para a sobrevivência do material ao processo (Panis & Thinh,

2001). Assim sendo, a desidratação do material à baixa temperatura, antes da criopreservação, é necessária para o sucesso do método de vitrificação. Os resultados deste trabalho indicam que um tratamento inicial de desidratação do material (PVS2), em banho de gelo durante 1 h, foi essencial para a sobrevivência e posterior germinação das sementes criopreservadas.

Neste trabalho, independentemente do tratamento empregado, todas as sementes germinadas desenvolveram plântulas normais. O procedimento descrito para a criopreservação de sementes maduras de *Dendrobium* Jaquelyn Thomas é relativamente simples e parcialmente viável. Porém, outros estudos devem ser direcionados para variações no teor de água inicial, antes da criopreservação, na tentativa de se obter maiores porcentagens de germinação. Além disso, diferenças genótípicas com relação aos tratamentos realizados antes da criopreservação devem ser avaliadas. Baseadas nessas duas últimas necessidades de pesquisa, um novo experimento foi desenvolvido utilizando-se sementes de três diferentes cultivares de *Dendrobium* com teores de água inicial mais elevados.

## **2. Criopreservação de sementes de *Dendrobium* Sena Red Thailand, *Dendrobium* BFC Pink e de *Dendrobium* Mini W/RL**

As sementes de todas as cultivares continham embriões bem formados quando observadas em lupa. O teor de água inicial foi de 27, 17 e 24 % para o *Dendrobium* Sena Red Thailand, *Dendrobium* BFC Pink e *Dendrobium* Mini W/RL, respectivamente, sendo superiores ao do *Dendrobium* Jaquelyn Thomas (9 %) (Tabela 3).

**Tabela 3.** Características das sementes maduras de *Dendrobium* Sena Red Thailand, *D.* BFC Pink e de *D.* Mini W/RL, após 24 horas, em dessecador contendo sílica-gel.

Característica	Sena Red	BFC Pink	Mini W/RL
Tamanho da cápsula* <sup>1</sup> (comprimento x largura cm)	3,19 x 1,54	1,80 x 1,24	2,55 x 1,02
Massa da cápsula* <sup>1</sup> (g)	3,04	1,14	0,91
Tamanho da semente* <sup>2</sup> (comprimento x largura mm)	0,52 x 0,10	0,40 x 0,10	0,38 x 0,08
Massa de 100 sementes* <sup>3</sup> (mg)	0,15	0,14	0,10
Teor de água* <sup>3</sup> (% massa fresca)	27	17	24

\*<sup>1</sup> Média de 15, 16 e 8 cápsulas, respectivamente; \*<sup>2</sup> média de 50 sementes; \*<sup>3</sup> média de três repetições.

As sementes, mantidas em temperatura ambiente e germinadas em meio MS sem exposição ao PVS2 e sem imersão no NL (Controle 1), apresentaram as maiores porcentagens de germinação para todas as cultivares testadas (Tabelas 4 e 5). As sementes expostas ao PVS2, durante 3 horas, em banho de gelo e sem imersão em NL (Controle 2), tiveram sua germinação inibida apenas para o *D.* Jaquelyn Thomas (Tabela 5). Thammasiri (2000), trabalhando com sementes de *Doritis pulcherrima*, também não obteve germinação naquelas sementes que permaneceram em PVS2, porém, que não passaram pela criopreservação. Outras investigações devem ser feitas, para verificar um possível efeito prejudicial do PVS2 na germinação das sementes. As sementes expostas ao PVS2 no tempo zero e, em seguida, imersas em NL (Controle 3) apresentaram baixa porcentagem de germinação ou não germinaram, independentemente da cultivar (Tabelas 4 e 5).

**Tabela 4.** Germinação de sementes de *Dendrobium* Sena Red Thailand, *Dendrobium* BFC Pink e *Dendrobium* Mini W/RL, aos 2 meses após a retirada do nitrogênio líquido (NL). C1: sem PVS2 e sem NL; C2: 3 h PVS2 e sem NL; C3: 0 h PVS2 e no NL; T1 – T3 = tratamentos PVS2 em banho de gelo por 1, 2 ou 3 h.

Controle (C) Tratamento (T)	Temperatura	PVS2 (h)	NL <sup>w</sup>	Germinação (%)
<i>D. Sena Red</i>				
C1	TA <sup>z</sup>	Sem PVS2	-	96,09 ± 0,76
C2	BG <sup>y</sup>	3	-	95,38 ± 2,35
C3	TA	0	+	26,86 ± 8,34
T1	BG	1	+	56,27 ± 5,18
T2	BG	2	+	57,14 ± 7,32
T3	BG	3	+	64,32 ± 8,39
<i>D. BFC Pink</i>				
C1	TA <sup>z</sup>	Sem PVS2	-	63,72 ± 6,20
C2	BG <sup>y</sup>	3	-	65,08 ± 5,87
C3	TA	0	+	0,37 ± 0,24
T1	BG	1	+	4,98 ± 2,18
T2	BG	2	+	7,37 ± 2,89
T3	BG	3	+	6,65 ± 3,64
<i>D. Mini W/RL</i>				
C1	TA <sup>z</sup>	Sem PVS2	-	70,59 ± 7,49
C2	BG <sup>y</sup>	3	-	73,12 ± 6,04
C3	TA	0	+	6,08 ± 2,65
T1	BG	1	+	26,28 ± 3,80
T2	BG	2	+	24,68 ± 6,59
T3	BG	3	+	21,76 ± 4,80

<sup>z</sup>TA = Temperatura ambiente (27 ± 2 °C); <sup>y</sup>BG = Banho de gelo (0 °C)

<sup>w</sup>.- = sem imersão em NL; '+' = com imersão em NL.

Controles = C1 – C3. Tratamentos T1 – T3.

**Tabela 5.** *Dendrobium* Jaquelyn Thomas, aos 2 meses após a retirada do nitrogênio líquido (NL). C1: sem PVS2 e sem NL; C2: 3 h PVS2 e sem NL; C3: 0 h PVS2 e no NL; T1 – T3 = tratamentos PVS2 em banho de gelo por 1, 2 ou 3 h.

Controle (C) Tratamento (T)	Temperatura	PVS2 (h)	NL <sup>w</sup>	Germinação (%)
<i>D. Jaquelyn Thomas</i>				
C1	TA <sup>z</sup>	Sem PVS2	-	95,65 ± 0,70
C2	BG <sup>y</sup>	3	-	82,85 ± 7,26
C3	TA	0	+	0,00 ± 0,00
T1	BG	1	+	21,76 ± 8,47
T2	BG	2	+	12,57 ± 3,42
T3	BG	3	+	8,40 ± 7,73

<sup>z</sup>TA = Temperatura ambiente (27 ± 2 °C); <sup>y</sup>BG = Banho de gelo (0 °C)

<sup>w</sup>‘-’ = sem imersão em NL; ‘+’ = com imersão em NL.

Controles = C1 – C3. Tratamentos T1 – T3.

Segundo Pence (1992), a determinação do teor de água inicial do material é essencial para o êxito dos protocolos de criopreservação. Nas sementes de *Dendrobium* Jaquelyn Thomas, que possuíam teor de água inicial de 9 %, a maior porcentagem de germinação foi de 21,76 %. Para o *D. Sena Red Thailand*, *D. BFC Pink* e *D. Mini W/RL*, com teores de água inicial de 27, 17 e 24 %, as maiores porcentagens de germinação foram de 64,32; 7,37; e 26,28 %, respectivamente (Tabelas 4 e 5). Estes resultados sugerem que a sobrevivência das sementes ao processo de criopreservação, usando o método da vitrificação, independe do teor de água inicial das mesmas.

Para o tratamento, em que as sementes permaneceram no PVS2 durante uma hora em banho de gelo, a porcentagem de germinação foi de 21,76; 56,27; 4,98 e 26,28 %, respectivamente, para *Dendrobium* Jaquelyn Thomas, *Dendrobium* Sena Red Thailand, *Dendrobium* BFC Pink e *Dendrobium* Mini W/RL (Tabelas 4 e 5). Estes dados sugerem que a

resposta das sementes das cultivares de *Dendrobium* à criopreservação é dependente do genótipo. As diferenças encontradas podem estar correlacionadas com a composição química dos tecidos e com alguns genes dominantes para longevidade, hipóteses também levantadas por Mello (2000).

## CONCLUSÃO

- O método da vitrificação é necessário para a criopreservação das sementes das cultivares de orquídeas testadas.
- Para as cultivares de *Dendrobium* estudadas, a exposição das sementes, por uma hora, à solução PVS2 em banho de gelo antes de adicioná-las ao tanque de NL, é benéfica ao processo de criopreservação.

## BIBLIOGRAFIA

- BAJAJ, Y.P.S. Cryopreservation of plant cell, tissue, and organ culture for the conservation of germplasm and biodiversity. *In*: Bajaj, Y.P.S. ed. Cryopreservation of plant germplasm I. Biotechnology in Agriculture and Forestry, volume 32, Berlim, Springer, 1995. p. 3-28.
- ENGELMANN, F. Importance of desiccation for the cryopreservation of recalcitrant seed and vegetatively propagated species. *Plant Genetic Resources Newsletter*, 112: 9-18, 1997.
- FAHY, G.M.; MACFARLANE, D.R.; ANGELL, C.A. & MERYMAN, H.T. Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology*, 21: 407-426, 1984.
- HIRANO, T.; GODO, T.; MII, M. & ISHIKAWA, K. Cryopreservation of immature seeds of *Bletilla striata* by vitrification. *Plant Cell Reports*, 23:534-539, 2005.
- INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. International rules for seed testing. Rules 1 and Annexes 1993. *Seed Science & Technology*, 21:Supplement, 1-288, 1993.
- ISHIKAWA, K.; HARATA, K.; MII, M.; SAKAI, A.; YOSHIMATSU, K. & SHIMOMURA, K. Cryopreservation of zygotic embryos of Japanese terrestrial orchid (*Bletilla striata*) by vitrification. *Plant Cell Reports*, 16:754-757, 1997.
- MELLO, C.M.C. Conservação de sementes de orquídeas do cerrado. Brasília, 2000. 48p. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Brasília
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum*, 15:473-497, 1962.
- NISHIZAWA, S.; SAKAI, A.; AMANO, Y. & MATSUZAWA, T. Cryopreservation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) embryogenic suspension cells and subsequent plant regeneration by vitrification. *Plant Science*, 91:67-73, 1993.
- PANIS, B. & THINH, N.T. Cryopreservation of *Musa* germplasm. INIBAP Technical Guideline 5. *In*: Escalant, J.V.; Sharrock, S. eds. International Network for the improvement of banana and plantain, Montpellier, France. 2001.

- PENCE, V.C. Desiccation and the survival of *Aesculus*, *Castanea*, and *Quercus* embryo axes through cryopreservation. *Cryobiology*, 29:391-399, 1992.
- POPOVA, E.V.; NIKISHINA, T.V.; KOLOMEITSEVA, G.L. & POPOV, A.S. The effect of seed cryopreservation on the development of protocorms by the hybrid orchid *Bratonia*. *Russian Journal of Plant Physiology*, 50 (5):672-677, 2003.
- PRITCHARD, H.W. Liquid nitrogen preservation of terrestrial and epiphytic orchid seed. *Cryo-Letters*, 5:295-300, 1984.
- PRITCHARD, H.W.; POYNTER, A.L.C. & SEATON, P.T. Interspecific variation in orchid seed longevity in relation to ultra-dry storage and cryopreservation. *Lindleyana*, 14(2):92-101, 1999.
- SAKAI, A.; KOBAYASHI, S. & OIYAMA, I. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb.var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. *Plant Cell Reports*, 9:30-33, 1990.
- SAKAI, A.; KOBAYASHI, S. & OIYAMA, I. Survival by vitrification of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb.var. *brasiliensis* Tanaka) cooled to -196°C. *Journal Plant Physiology*, 137:465-470, 1991a.
- SAKAI, A.; KOBAYASHI, S. & OIYAMA, I. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb.) by a simple freezing method. *Plant Science*, 74:243-248, 1991b.
- SANTOS, I.R.I. Criopreservação de germoplasma vegetal. *Biotechnologia Ciência & Desenvolvimento* 20:60-65, 2001.
- SINGH, F. Differential staining of orchid seeds for viability testing. *American Orchid Society Bulletin* 50(4):416-418. 1999.
- THAMMASIRI, K. Cryopreservation of seeds of a Thai orchid (*Doritis pulcherrima* Lindl.) by vitrification. *Cryo-Letters*, 21: 237-244, 2000.
- TSUKASAKI, H.; MII, M.; TOKUHARA, K. & ISHIKAWA, K. Cryopreservation of *Doritaenopsis* suspension culture by vitrification. *Plant Cell Reports*, 19:1160-1164, 2000.
- WANG, J.H.; GE, J.G.; LIU, F.; BIAN, H.W. & HUANG, C.N. Cryopreservation of seeds and protocorms of *Dendrobium candidum*. *Cryo-Letters*, 19:123-128, 1998.
- YAMADA, T.; SAKAI, A.; MATSUMURA, T. & HIGUCHI, S. Cryopreservation of apical meristems of white clover (*Trifolium repens* L.) by vitrification. *Plant Science*, 78:81-87, 1991.

# **CRIOPRESERVAÇÃO DE PÓLEN DE *DENDROBIUM***

## **CAPÍTULO 2**

## RESUMO

O armazenamento de pólen tem sido uma preocupação crescente nos programas de melhoramento genético de plantas e tem também grande importância como forma de preservação do material genético. O método da vitrificação foi testado na criopreservação de pólen de duas diferentes cultivares do gênero *Dendrobium*. Esse gênero possui os grãos de pólen agrupados em quatro políneas. A vitrificação incluiu a exposição das políneas à solução de vitrificação (PVS2) e, em seguida, o armazenamento em NL. Os tratamentos consistiram de um fatorial 4 x 2, em que as políneas permaneceram 1, 2, 3 ou 4 h na solução de PVS2, em temperatura ambiente ou em banho de gelo. Os controles consistiram de: polinização direta das flores (pólen sem PVS2 e sem NL); pólen por 2 h em PVS2 em banho de gelo e sem NL; pólen em PVS2 no tempo zero e no NL; e pólen colocado diretamente no NL sem tratamento de vitrificação. As políneas permaneceram em NL durante 48 h. Após esse período, as políneas foram descongeladas e utilizadas para polinizar novas flores. A sobrevivência das políneas ao processo de criopreservação foi determinada pela formação de cápsulas e de sementes viáveis. Não houve diferença significativa, tanto entre os tratamentos, quanto entre estes e os controles para as duas cultivares testadas. Todas as cápsulas, de todos os tratamentos, produziram sementes viáveis. O método de vitrificação não foi necessário para criopreservar o pólen das cultivares de *Dendrobium* usadas nesse experimento. Para as cultivares testadas, o simples armazenamento do pólen em NL é suficiente para sua criopreservação.

**Palavras-chave:** Vitrificação; Orquídeas; Orchidaceae; Banco de germoplasma.

## INTRODUÇÃO

O armazenamento de pólen é de grande importância no melhoramento genético e na produção de vegetais de diversas espécies, eliminando as barreiras existentes, quanto à época de floração, localização e disponibilidade das plantas para os cruzamentos. Este método é também importante forma de preservação de material genético em bancos de germoplasma (Grout & Roberts, 1995; Sacks & St. Clair, 1996).

Os métodos convencionais, reduzindo a temperatura e a umidade dos grãos de pólen, permitem o armazenamento dos mesmos por curtos períodos de tempo, geralmente não superiores a quatro anos (Grout & Roberts, 1995). Dessa forma, o desenvolvimento de métodos que permitam a conservação de pólen por longos períodos de tempo é bastante desejável.

A conservação de pólen por longos períodos de tempo proporciona vários benefícios para os programas de melhoramento genético das plantas cultivadas e para a conservação de germoplasma de espécies raras ou em risco de extinção (Connor & Towill, 1993). Com a criação dos bancos de pólen, não será necessário esperar pelo crescimento e florescimento da planta para obter o parental masculino. Isso trás benefícios óbvios para as espécies que apresentam longa fase juvenil, ou que floresçam poucas vezes ao ano, ou, ainda, para algumas espécies que são propagadas vegetativamente (Towill, 2000). As plantas da família Orchidaceae se enquadram em todas essas categorias.

A criopreservação, ou conservação a ultra-baixas temperaturas, permite o armazenamento de pólen, por longos períodos de tempo, mantendo a estabilidade genética do material. Pólen de diversas plantas vem sendo criopreservado como, por exemplo, *Glycine max*, *Zea mays*, *Solanum tuberosum*, *Citrus spp.*, *Mangifera indica*, dentre várias outras de grande importância para a agricultura (Grout & Roberts, 1995).

O método normalmente adotado para a criopreservação de pólen é a imersão direta em NL, após desidratação prévia por um agente dessecante.

Alguns trabalhos utilizam agentes crioprotetores como DMSO, polietileno glicol e açúcares (Towill, 1985; Liang *et al.*, 1993; Tai & Miller, 2002; Parton, *et al.*, 2002). Melhores resultados têm sido obtidos, quando o teor de água está abaixo de 20 %. A determinação da viabilidade dos grãos de pólen após a criopreservação pode ser feita *in vitro* (Towill, 1985; Ganeshan & Alexander, 1990; Craddock *et al.*, 2000) ou *ex vitro* (Ganeshan, 1986; Bhattacharya & Mandal, 1997).

As orquídeas estão se transformando, rapidamente, em uma das principais plantas ornamentais cultivadas. Atualmente, é a segunda flor em vaso mais produzida dos EUA, atrás apenas das *Poinsettia*. Com a crescente demanda por novos híbridos e variedades, os programas de fitomelhoramento são essenciais para fornecer, à indústria, materiais novos e de qualidade superior. Nesse contexto, o desenvolvimento de métodos de criopreservação de pólen, bem como de sementes, permitirá a formação de bancos de germoplasma. Esses bancos facilitarão a procura por materiais, para os novos cruzamentos, e permitirão o armazenamento de grande variabilidade genética em pequeno espaço e a custos menores.

Os grãos de pólen das plantas da família Orchidaceae estão reunidos em estruturas denominadas políneas. O gênero *Dendrobium* possui os grãos de pólen agrupados em quatro políneas (Sheehan & Sheehan, 1994).

Embora vários protocolos para criopreservação de pólen de diversas espécies já tenham sido desenvolvidos (Grout & Roberts, 1995), não foi encontrado na literatura revisada trabalho envolvendo a criopreservação de pólen de plantas da família Orchidaceae.

Com base na carência de trabalhos relativos à criopreservação de pólen em orquídeas, os objetivos deste trabalho foram desenvolver um protocolo para a criopreservação de pólen de duas cultivares de *Dendrobium*, utilizando o método da vitrificação e estudar o efeito da criopreservação na viabilidade dos grãos de pólen.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os trabalhos foram conduzidos no Laboratório de Horticultura Ornamental e nas Casas de Vegetação do Tropical Research and Education Center, na Universidade da Flórida, em Homestead, Flórida.

### 1. Material

Plantas de duas cultivares de *Dendrobium*, *D. Sena Red Thailand* e *D. Mini W/RL*, em plena floração, foram fornecidas por Kerry's Bromeliad Nursery, Inc., 'Klassic Beauty', Homestead, Flórida, EUA, em dezembro de 2004.

O pólen foi coletado de flores completamente abertas e utilizado imediatamente na montagem do experimento. Três amostras, contendo quatro políneas cada, foram colocadas em uma estufa a 103 °C por 17 h e, em seguida, o teor de água foi determinado (International Seed Testing Association, 1993).

### 2. Tratamentos

Os tratamentos consistiram em deixar as políneas em contato com a solução PVS2 em temperatura ambiente,  $27 \pm 2$  °C, ou em banho de gelo, 0 °C, durante 1, 2, 3 ou 4 h, antes da imersão em NL. Foram instalados quatro controles. No Controle 1, as políneas coletadas de uma flor foram utilizadas imediatamente para polinizar uma outra flor. No segundo controle, as políneas permaneceram em contato com a solução de vitrificação PVS2 durante 2 h, porém sem serem imersas em NL. Nos controles 3 e 4, as políneas foram imersas diretamente em NL, respectivamente, com ou sem adição de PVS2. As políneas permaneceram no NL, durante 48 h.

Cada grupo de quatro políneas extraídas de uma mesma flor foi transferido para um criotubo, onde recebeu determinado tratamento. Um

mililitro da solução de pré-vitrificação, composta de glicerol  $2 \text{ mol L}^{-1}$  e sacarose  $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ , foi adicionado nos criotubos de todos os tratamentos e nos controles 2 e 3. As políneas foram deixadas em contato com essa solução durante 30 min, à temperatura ambiente, antes da adição da solução de vitrificação. Essa solução, denominada PVS2 (Sakai *et al.*, 1990), foi composta de 30 % (v/v) de glicerol, 15 % (v/v) de etileno glicol e 15 % (v/v) de DMSO, com adição, ainda, de  $0,4 \text{ mol L}^{-1}$  de sacarose; e tendo o pH ajustado para  $5,7 \pm 0,1$ . As políneas permaneceram em contato com a solução PVS2 por 1, 2, 3 e 4h em banho de gelo (I-1, I-2, I-3, I-4) ou em temperatura ambiente (R-1, R-2, R-3, R-4); e, em seguida, foram introduzidas no NL.

Após 48 h em NL, as políneas de todos os tratamentos e dos controles 2, 3 e 4 foram retiradas do NL e descongeladas à temperatura ambiente, o que ocorreu em um tempo de aproximadamente 30 min. Após o descongelamento, a solução PVS2 foi removida de cada criotubo, utilizando-se pipeta automática. Um mililitro de solução de sacarose  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ , pH  $5,7 \pm 0,1$ , foi adicionado aos criotubos de todos os tratamentos e dos controles 2 e 3, e deixado em contato com as políneas, durante 1 h. Em seguida, as políneas foram enxaguadas em água desionizada. O grupo das quatro políneas de cada um dos tratamentos e controles foi utilizado para polinizar uma flor. Todas as flores foram emasculadas, antes da polinização. Todas as plantas permaneceram em casa de vegetação, durante os seis meses de condução do experimento.

A sobrevivência das políneas ao processo de criopreservação foi determinada pela formação de frutos e de sementes viáveis, sendo expressa em porcentagem de germinação dos grãos de pólen.

A viabilidade das sementes foi determinada usando-se o método do tetrazólio. Este consiste em colocar uma amostra de sementes em uma solução a 1 % (p/v) de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC), pH  $6,5 \pm 0,1$ , durante 24 h no escuro e em temperatura de 27 a 30 °C. A solução de TTC que é incolor, em contato com células vivas sofre redução pela ação de redutases e desidrogenases celulares, formando um composto de coloração vermelha, denominado formazan. Desse modo, tecidos vivos, após

permanecer em contato com o TTC, apresentam uma coloração rósea ou avermelhada (Singh, 1999).

### **3. Delineamento experimental e análises estatísticas**

O experimento foi montado segundo um esquema fatorial 4 x 2 (4 períodos de incubação das políneas em PVS2 e duas temperaturas) para os tratamentos e mais quatro controles, no delineamento inteiramente casualizado, com 10 repetições. Cada repetição consistiu de um criotubo, contendo 4 políneas provenientes de uma única flor e utilizadas para polinizar, em conjunto, uma nova flor. Os dados de germinação foram analisados utilizando-se estatística descritiva.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As políneas das duas cultivares testadas apresentaram teores de água inicial abaixo de 1 %. Segundo Connor & Towill (1993), embora indiquem um teor de água dos grãos de pólen abaixo dos 20 % para que sejam criopreservados com êxito, não há, ainda, estudos definindo qual a umidade mínima, para que o pólen ainda mantenha sua viabilidade. Para as cultivares testadas neste trabalho, o pólen permaneceu viável, mesmo em teores baixos de água, o que indica que o pólen é tolerante à desidratação. De modo geral, plantas que possuem sementes ortodoxas possuem pólen sensível (Towill, 2002), não obstante os resultados indicarem que as cultivares *Dendrobium* Sena Red Thailand e *D. Mini W/RL* sejam uma exceção (Tabelas 1 e 2).

Os grãos de pólen apresentaram alta porcentagem de germinação, independente do tratamento e da cultivar (Tabelas 1 e 2).

Os grãos de pólen de *Dendrobium* Sena Red Thailand que não passaram por nenhum tratamento de vitrificação e nem pela criopreservação (Controle 1) apresentaram menor porcentagem de germinação (60 %), indicando um possível efeito positivo dos tratamentos na viabilidade dos grãos de pólen (Tabela 1). A criopreservação aumenta o poder de germinação em sementes de algumas espécies (Towill, 2002). Esse efeito parece ser devido à quebra de dormência das mesmas. Porém, na literatura consultada não foi encontrado trabalho sobre a melhoria no poder de germinação de grãos de pólen de orquídeas, em consequência do armazenamento em baixas temperaturas. Os demais controles, em que as políneas permaneceram em contato com a solução de vitrificação PVS2 durante 2 h e sem serem imersas em NL (Controle 2), ou que foram imersas diretamente em NL, com (Controle 3), ou sem (Controle 4) adição de PVS2, apresentaram altas porcentagens de germinação dos grãos de pólen, 90, 100 e 80 %, respectivamente (Tabela1).

**Tabela 1.** Germinação de grãos de pólen de *Dendrobium* Sena Red Thailand. C1: sem PVS2 e sem NL; C2: 2 h PVS2 e sem NL; C3: 0 h PVS2 e no NL; C4: sem PVS2 e no NL; T1 – T4 = tratamentos PVS2 em temperatura ambiente por 1, 2, 3 ou 4h; T5 – T8 = tratamentos PVS2 em banho de gelo por 1, 2, 3 ou 4h;

Controle (C) Tratamento (T)	Temperatura	PVS2 (h)	NL <sup>w</sup>	Germinação (%)
C1	TA <sup>z</sup>	Sem PVS2	-	60 ± 51
C2	BG <sup>y</sup>	2	-	90 ± 31
C3	TA	0	+	100 ± 0
C4	TA	Sem PVS2	+	80 ± 42
T1	TA	1	+	80 ± 42
T2	TA	2	+	80 ± 42
T3	TA	3	+	70 ± 48
T4	TA	4	+	80 ± 42
T5	BG	1	+	100 ± 0
T6	BG	2	+	90 ± 31
T7	BG	3	+	60 ± 51
T8	BG	4	+	100 ± 0

<sup>z</sup>TA = Temperatura ambiente (27 ± 2 °C); <sup>y</sup>BG = Banho de gelo (0 °C);

<sup>w</sup>‘-’ = sem imersão em NL; ‘+’ = com imersão em NL.

Controles = C1 – C4. Tratamentos = T1 – T8;

A menor germinação foi obtida no tratamento em que as políneas permaneceram por 3 h em PVS2 (60 %) sendo semelhante ao resultado obtido no controle em que as políneas não passaram por tratamento de vitrificação e de criopreservação (Tabela 1).

Em todos os tratamentos houve alta porcentagem de germinação das políneas independente do tempo de exposição ao PVS2 e da temperatura empregada (Figura 1).

Para todos os controles e tratamentos, houve alta porcentagem de germinação dos grãos de pólen de *Dendrobium* Mini W/RL (Tabela 2).

**Tabela 2.** Germinação de grãos de pólen de *Dendrobium* Mini W/RL. C1: sem PVS2 e sem NL; C2: 2 h PVS2 e sem NL; C3: 0 h PVS2 e no NL; C4: sem PVS2 e no NL; T1 – T4 = tratamentos PVS2 em temperatura ambiente por 1, 2, 3 ou 4h; T5 – T8 = tratamentos PVS2 em banho de gelo por 1, 2, 3 ou 4h;

Controle (C) Tratamento (T)	Temperatura	PVS2 (h)	NL <sup>w</sup>	Germinação (%)
C1	TA <sup>z</sup>	Sem PVS2	-	80 ± 42
C2	BG <sup>y</sup>	2	-	80 ± 42
C3	TA	0	+	100 ± 0
C4	TA	Sem PVS2	+	90 ± 31
T1	TA	1	+	100 ± 0
T2	TA	2	+	90 ± 31
T3	TA	3	+	90 ± 31
T4	TA	4	+	100 ± 0
T5	BG	1	+	80 ± 42
T6	BG	2	+	100 ± 0
T7	BG	3	+	80 ± 42
T8	BG	4	+	90 ± 31

<sup>z</sup>TA = Temperatura ambiente (27 ± 2 °C); <sup>y</sup>BG = Banho de gelo (0 °C);

<sup>w</sup>‘-’ = sem imersão em NL; ‘+’ = com imersão em NL.

Controles = C1 – C4. Tratamentos = T1 – T8;

Do mesmo modo que para o *Dendrobium* Sena Red, os processos de vitrificação e de criopreservação não influenciaram na capacidade de germinação dos grãos de pólen de *D. Mini W/RL* (Tabela 2).

Todas as cápsulas produzidas pelas duas cultivares testadas, independentemente do tratamento, produziram sementes viáveis.

O método de vitrificação não foi necessário para criopreservar o pólen das cultivares de *Dendrobium* usadas neste experimento. Para as cultivares testadas, o simples armazenamento do pólen em NL foi suficiente para sua criopreservação. Este resultado pode ser devido ao baixo teor de água inicial

das políneas de ambas as cultivares testadas. Em testes posteriores, políneas de *Dendrobium* Salaya Fancy com teor de água inicial de 27 %, após imersão direta em NL, não foram capazes de germinar. Entretanto, políneas de *Phalaenopsis* Newberry Parfalt Picotee, com teor de água de 22 %, apresentaram 60 % de germinação, após imersão direta em NL (dados não publicados). Esses resultados indicam que além do teor de água inicial, características genóticas parecem interferir na sobrevivência das políneas ao processo de criopreservação.

## CONCLUSÃO

- O método da vitrificação não aumentou a sobrevivência das políneas de *Dendrobium* Sena Red Thailand e *D. Mini W/RL* à criopreservação.
- Para essas cultivares, o simples armazenamento do pólen no NL é suficiente para sua criopreservação.

## BIBLIOGRAFIA

- BHATTACHARYA, A.; MANDAL, S. Studies on *in vivo* pollen germination of some angiospermic plants. *Journal of Palynology*, 33:153-164, 1997.
- CONNOR, K.F.; TOWILL, L.E. Pollen-handling protocol and hydration/dehydration characteristics of pollen for application to long-term storage. *Euphytica*, 68:77-84, 1993.
- CRADDOCK, J.H.; REED, S.M.; SCHLARBAUM, S.E.; SAUVE, R.J. Storage of flowering dogwood (*Cornus florida* L.) pollen. *HortScience*, 35(1):108-109, 2000.
- GANESHAN, S. Cryogenic preservation of papaya pollen. *Scientia Horticulturae*, 28:65-70, 1986.
- GANESHAN, S.; ALEXANDER, M.P. Fertilizing ability of cryopreserved grape (*Vitis vinifera* L.) pollen. *Vitis*, 29:145-150, 1990.
- GROUT, B.W.W.; ROBERTS, A.V. Storage of free pollen, pollen embryos and the zygotic embryos of seed by cryopreservation and freeze drying. *In: Grout, B.W.W. ed. Genetic preservation of plant cells in vitro*. Berlin, Springer, 1995, p.63-74.
- LIANG, L.; XU, B.F.; ZHENG, C.Y.; ZHOU, C. Pollen cryopreservation and pollen protoplast isolation in *Brassica campestris* var. *purpurea*. *Acta Botanica-Sinica*, 35(10):733-738, 1993.
- PARTON, E.; VERVAEKE, I.; DELEN, R.; VANDENBUSSCHE, R.; DEROOSE, R.; DE PROFT, M. Viability and storage of bromeliad pollen. *Euphytica*, 125:155-161, 2002.
- SACKS, E.J.; ST-CLAIR, D.A. Cryogenic storage of tomato pollen: effect on fecundity. *HortScience*, 31 (3): 447-448, 1996.
- SAKAI, A.; KOBAYASHI, S.; OIYAMA, I. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. *Plant Cell Reports*, 9:30-33, 1990.
- SHEEHAN, T.; SHEEHAN, M. An illustrated survey of orchid genera. Portland, Oregon, Timber Press, 1994. 421p.
- SINGH, F. Differential staining of orchid seeds for viability testing. *American Orchid Society Bulletin* 50(4):416-418. 1999.
- TAI, P.Y.P.; MILLER, J.D. *In vivo* viability assay of sugarcane pollen stored at ultra low temperature following preservation treatments. *Sugar Cane International*, Jan/Fev: 5-9, 2002.

- TOWILL, L.E. Low temperature and freeze/vacuum-drying preservation of pollen. *In: Kartha, K.K., ed. Cryopreservation of plant cells and organs.* Florida, CRC Press, 1985. p. 172-198.
- TOWILL, L.E. Germplasm preservation. *In: Trigiano, R. N.; Gray, D. J. ed. Plant tissue culture concepts and laboratory exercises.* Boca Raton, CRC Press, 2000. p. 337-353.
- TOWILL, L.E. Cryopreservation of plant germplasm. *In: Towill, L.E.; Bajaj, Y.P.S. eds. Cryopreservation of plant germplasm II. Biotechnology in Agriculture and Forestry, volume 50, Berlin, Springer, 2002. p. 04-21.*

## CONCLUSÕES GERAIS

No presente estudo buscou-se o estabelecimento de protocolos eficientes e viáveis, mediante o ajuste do método de vitrificação, para criopreservação de sementes maduras e de pólen de orquídeas. Os resultados permitiram concluir que:

- O método da vitrificação é necessário para a criopreservação das sementes das cultivares de orquídeas testadas. Porém, não aumentou a sobrevivência das pólineas de *Dendrobium* Sena Red Thailand e *D. Mini W/RL* à criopreservação. Para essas cultivares, o simples armazenamento do pólen no NL é suficiente para sua criopreservação.
- Para as cultivares de *Dendrobium* estudadas, a exposição das sementes, por uma hora, à solução PVS2 em banho de gelo antes de adicioná-las ao tanque de NL, é benéfica ao processo de criopreservação.

## BIBLIOGRAFIA

- BAJAJ, Y.P.S. Cryopreservation of plant cell, tissue, and organ culture for the conservation of germplasm and biodiversity. *In: Bajaj, Y.P.S. ed. Cryopreservation of plant germplasm I. Biotechnology in Agriculture and Forestry*, volume 32, Berlim, Springer, 1995. p. 03-28.
- BHATTACHARYA, A. & MANDAL, S. Studies on *in vivo* pollen germination of some angiospermic plants. *Journal of Palynology*, 33:153-164, 1997.
- BORROMEO, C.R. Storing orchid seed in a mini-dessicator. *American Orchid Society Bulletin*, 43(3):106, 1974.
- BOWLING, J.C. & THOMPSON, P.A. On storing orchid seed. *Orchid Review*, 80:120-121, 1972.
- CONNOR, K.F. & TOWILL, L.E. Pollen-handling protocol and hydration/dehydration characteristics of pollen for application to long-term storage. *Euphytica*, 68:77-84, 1993.
- CRADDOCK, J.H.; REED, S.M.; SCHLARBAUM, S.E. & SAUVE, R.J. Storage of flowering dogwood (*Cornus florida* L.) pollen. *HortScience*, 35(1):108-109, 2000.
- CROWE , J.H.; CROWE, L.M.; CARPENTER, J.F. RUDOLPH, A.S.; AURELL WISTROM, C.; SPARGO, B.J. & ANCHORDOGUY, T.J. Interactions of sugars with membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 947: 367-384, 1988.
- DRESSLER, R. L. Phylogeny and classification of the orchid family. 1.ed. Portland, Dioscorides Press, 1993. 314p.
- EFENDI, D. Transformation and cryopreservation of embryogenic avocado (*Persea americana* Mill.) cultures. Homestead, 2003. 165p. Dissertação (Doutorado) – University of Florida.
- ENGELMANN, F. Importance of desiccation for the cryopreservation of recalcitrant seed and vegetatively propagated species. *Plant Genetic Resources Newsletter*, 112: 9-18, 1997.
- ENGELMANN, F. Plant cryopreservation: progress and prospects. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 40 (5): 427-433, 2004.
- FAHY, G.M.; MACFARLANE, D.R.; ANGELL, C.A. & MERYMAN, H.T. Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology*, 21: 407-426, 1984.

- FORD-LLOYD, B.V. & JACKSON, M.T. Biotechnology and methods of conservation of plant genetic resources. *Journal of Biotechnology*, 17: 247-256, 1991.
- FRANKS, F. The properties of aqueous solutions at subzero temperatures. In: Franks, F. ed. *Water: a comprehensive treatise*. New York, Plenum Press, 1982. p.215-338.
- GANESHAN, S. Cryogenic preservation of papaya pollen. *Scientia Horticulturae*, 28:65-70, 1986.
- GANESHAN, S. & ALEXANDER, M.P. Fertilizing ability of cryopreserved grape (*Vitis vinifera* L.) pollen. *Vitis*, 29:145-150, 1990.
- GREATWOOD, J. Extract from the proceedings of the International Orchid Commission, March, 1984. *American Orchid Society Bulletin*, 53:737, 1984.
- GRIN – Germplasm Research Information Network (Internet: [www.ars-grin.gov](http://www.ars-grin.gov), 19 de agosto de 2005).
- GROUT, B.W.W. & ROBERTS, A.V. Storage of free pollen, pollen embryos and the zygotic embryos of seed by cryopreservation and freeze drying. In: Grout, B.W.W. ed. *Genetic preservation of plant cells in vitro*. Berlin, Springer, 1995, p.63-74.
- HASEGAWA, A.; GOI, M.; SATO, M. & IHARA, Y. Fundamental studies on the asymbiotic seed germination of *Calanthe*. *Technical Bulletin of the Faculty of Agriculture Kagawa University*, 29:251-259, 1978.
- HIRANO, T.; GODO, T.; MII, M. & ISHIKAWA, K. Cryopreservation of immature seeds of *Bletilla striata* by vitrification. *Plant Cell Reports*, 23:534-539, 2005.
- INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. International rules for seed testing. Rules 1 and Annexes 1993. *Seed Science & Technology*, 21:Supplement, 1-288, 1993.
- ISHIKAWA, K.; HARATA, K.; MII, M.; SAKAI, A.; YOSHIMATSU, K. & SHIMOMURA, K. Cryopreservation of zygotic embryos of Japanese terrestrial orchid (*Bletilla striata*) by vitrification. *Plant Cell Reports*, 16:754-757, 1997.
- ITO, I. Ultra-low temperature storage of orchid pollinia and seeds. *Japanese Orchid Society Bulletin*, 11:4-15, 1965.
- KANO, K. Studies on the media for orchid seed germination. *Mem. Faculty of Agriculture Kagawa University*, 20:1-67, 1965.
- KARTHA, K.K. Meristem culture and germplasm preservation. In: Kartha, K.K. ed. *Cryopreservation of plant cells and organs*. Boca Raton, CRC Press, 1985. p. 115-134.

- KNUDSON, L. Further observations on nonsymbiotic germination of orchid seeds. *Botanical Gazette*, 77:212-219, 1924.
- KNUDSON, L. Storage and viability of orchid seed. *American Orchid Society Bulletin*, 2:66, 1934.
- KNUDSON, L. Viability of orchid seed. *American Orchid Society Bulletin*, 9:36-38, 1940.
- KNUDSON, L. Viability of orchid seed. *American Orchid Society Bulletin*, 22:260-261, 1953.
- KOPOWITZ, H. & WARD, R. A technological solution for the practical conservation of orchid species. *Orchid Advocate*, 10:43-45, 1984.
- KOSTER, K.L. Glass formation and desiccation tolerance in seeds. *Plant Physiology*, 96: 302-304, 1991.
- LATTA, R. Preservation of suspension cultures of plant cells by freezing. *Canadian Journal of Botany*, 49:1253-1254, 1971.
- LIANG, L.; XU, B.F.; ZHENG, C.Y. & ZHOU, C. Pollen cryopreservation and pollen protoplast isolation in *Brassica campestris* var. *purpurea*. *Acta-Botanica-Sinica*, 35(10):733-738, 1993.
- LIMARTHA, I. Influence of media and seed storage time on orchid germination. *Hawaii Orchid Journal*, 4:6-8, 1975.
- MAZUR, P. Freezing injury in plants. *Annual Review Plant Physiology*, 20-419-445, 1969.
- MEEYOT, W. & KAMEMOTO, H. Studies on storage of orchid pollen. *Amer. Orchid Soc. Bull.*, 38:388-393, 1969.
- MELLO, C.M.C. Conservação de sementes de orquídeas do cerrado. Brasília, 2000. 48p. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Brasília
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15:473-497, 1962.
- NISHIZAWA, S.; SAKAI, A.; AMANO, Y. & MATSUZAWA, T. Cryopreservation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) embryogenic suspension cells and subsequent plant regeneration by vitrification. *Plant Science*, 91:67-73, 1993.
- PANIS, B. & THINH, N.T. Cryopreservation of *Musa* germplasm. INIBAP Technical Guideline 5. In: Escalant, J.V.; Sharrock, S. eds. International Network for the improvement of banana and plantain, Montpellier, France. 2001.

- PARTON, E.; VERVAEKE, I.; DELEN, R.; VANDENBUSSCHE, R.; DEROOSE, R. & DE PROFT, M. Viability and storage of bromeliad pollen. *Euphytica*, 125:155-161, 2002.
- PENCE, V.C. Desiccation and the survival of *Aesculus*, *Castanea*, and *Quercus* embryo axes through cryopreservation. *Cryobiology*, 29:391-399, 1992.
- POPOVA, E.V.; NIKISHINA, T.V.; KOLOMEITSEVA, G.L. & POPOV, A.S. The effect of seed cryopreservation on the development of protocorms by the hybrid orchid *Bratonia*. *Russian Journal of Plant Physiology* 50 (5):672-677, 2003.
- PRITCHARD, H.W. Liquid nitrogen preservation of terrestrial and epiphytic orchid seed. *Cryo-Letters*, 5:295-300, 1984.
- PRITCHARD, H.W. Determination of orchid seed viability using fluorescein diacetate. *Plant Cell and Environment*, 8:727-730, 1985a.
- PRITCHARD, H.W. Growth and storage of orchid seeds. *In*: K.W. Tan, ed., *Proceedings of the eleventh world orchid conference*. 11<sup>th</sup> W.O.C. Inc., Miami, Florida, 1985b. p.290-293.
- PRITCHARD, H.W. Orchid seed storage at the Royal Botanic Gardens, Kew, England. 2. Physiology Unit, Wakehurst Place. *Orchid Research Newsletter*, 7:18, 1986.
- PRITCHARD, H.W.; POYNTER, A.L.C. & SEATON, P.T. Interspecific variation in orchid seed longevity in relation to ultra-dry storage and cryopreservation. *Lindleyana*, 14(2):92-101, 1999.
- PRITCHARD, H.W. & PRENDERGAST, F.G. Factors influencing the germination and storage of orchid pollen. *In*: Pritchard, H.W. ed. *Modern methods in orchid conservation: the role of physiology ecology and management*, Cambridge, Cambridge University Press, UK, 1989. p.1-16.
- PRITCHARD, H.W. & SEATON, P.T. Orchid seed storage: historical perspective, current status, and future prospects for long-term conservation. *Selbyana*, 14:89-104, 1993.
- QUATRANO, R.S. Freeze-preservation of cultures flax cells utilizing dimethyl sulfoxide. *Plant Physiology*, 43:2057-2061, 1968.
- REED, B.M. Implementing cryopreservation for long-term germplasm preservation in vegetatively propagated species. *In*: Towill, L.E.; Bajaj, Y.P.S. eds. *Cryopreservation of plant germplasm II. Biotechnology in Agriculture and Forestry*, volume 50, Berlin, Springer, 2002. p. 22-33.
- ROBERTS, E.H. Predicting the storage life of seeds. *Seed Science & Technology*, 1: 499-514, 1973.

- SACKS, E.J. & ST-CLAIR, D.A. Cryogenic storage of tomato pollen: effect on fecundity. *HortScience*, 31 (3): 447-448, 1996.
- SAKAI, A. The frost-hardening process of woody plants. VIII. Relation of polyhydric alcohols to frost hardiness. *Low Temperature Science Serie B*, 18:15-22, 1960.
- SAKAI, A. & YOSHIDA, S. The role of sugar and related compounds in variations of freezing resistance. *Cryobiology*, 5(3): 160-174, 1968.
- SAKAI, A.; KOBAYASHI, S. & OIYAMA, I. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb.var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. *Plant Cell Reports*, 9:30-33, 1990.
- SAKAI, A.; KOBAYASHI, S. & OIYAMA, I. Survival by vitrification of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb.var. *brasiliensis* Tanaka) cooled to -196°C. *Journal Plant Physiology*, 137:465-470, 1991a.
- SAKAI, A.; KOBAYASHI, S. & OIYAMA, I. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb.) by a simple freezing method. *Plant Science*, 74:243-248, 1991b.
- SANTOS, I.R.I. Criopreservação de germoplasma vegetal. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento* 20:60-65, 2001.
- SEATON, P.T. Investigations to establish improved techniques for seed storage, germination and culture of seedlings of *Cattleya aurantiaca*. Wolverhampton, UK, 1985. Dissertação (Mestrado) – The Polytechnic.
- SEATON, P.T. Orchid seed and pollen storage. *American Orchid Society Bulletin*, 63(8):918-922, 1994.
- SEATON, P.T. & HAILES, S.J. Effect of temperature and moisture content on the viability of *Cattleya aurantiaca* seed. *In: Pritchard, H.W., ed. Modern methods in orchid conservation: the role of physiology, ecology and management.* Cambridge, Cambridge University Press, UK, 1989. p. 17-29.
- SEATON, P.T. & PRITCHARD, H.W. Recent development in orchid seed banking. *Proceedings of the World Orchid Conference, Vancouver*, 390-396, 1999.
- SHEEHAN, T. & SHEEHAN, M. An illustrated survey of orchid genera. Portland, Oregon, Timber Press, 1994. 421p.
- SIMIONE, F.P. Cryopreservation manual. Nalge Nunc International Corp., 1998. 8p.
- SINGH, F. Differential staining of orchid seeds for viability testing. *American Orchid Society Bulletin* 50(4):416-418. 1999.
- SVIHLA, R.D. & OSTERMAN, E. Growth of orchid seed after dehydration from the freeze state. *Science (Washington DC)*, 98:23-24, 1943.

- TAI, P.Y.P. & MILLER, J.D. *In vivo* viability assay of sugarcane pollen stored at ultra low temperature following preservation treatments. Sugar Cane International, Jan/Fev: 5-9, 2002.
- THAMMASIRI, K. Cryopreservation of seeds of a Thai orchid (*Doritis pulcherrima* Lindl.) by vitrification. Cryo-Letters, 21: 237-244, 2000.
- THORNHILL, A. & KOOPOWITZ, H. Viability of *Disa uniflora* Berg (Orchidaceae) seeds under variable storage conditions: Is orchid gene-banking possible? Biological Conservation, 62:21-27, 1992.
- TOWILL, L.E. Low temperature and freeze/ vacuum-drying preservation of pollen. *In*: Kartha, K.K., ed. Cryopreservation of plant cells and organs. Florida, CRC Press, 1985. p. 172-198.
- TOWILL, L.E. Germplasm preservation. *In*: Trigiano, R. N.; Gray, D. J. ed. Plant tissue culture concepts and laboratory exercises. Boca Raton, CRC Press, 2000. p. 337-353.
- TOWILL, L.E. Cryopreservation of plant germplasm. *In*: Towill, L.E.; Bajaj, Y.P.S. eds. Cryopreservation of plant germplasm II. Biotechnology in Agriculture and Forestry, volume 50, Berlin, Springer, 2002. p. 04-21.
- TSUKASAKI, H.; MII, M.; TOKUHARA, K. & ISHIKAWA, K. Cryopreservation of *Doritaenopsis* suspension culture by vitrification. Plant Cell Reports, 19:1160-1164, 2000.
- WANG, J.H.; GE, J.G.; LIU, F.; BIAN, H.W. & HUANG, C.N. Cryopreservation of seeds and protocorms of *Dendrobium candidum*. Cryo-Letters, 19:123-128, 1998.
- YAMADA, T.; SAKAI, A.; MATSUMURA, T. & HIGUCHI, S. Cryopreservation of apical meristems of white clover (*Trifolium repens* L.) by vitrification. Plant Science, 78:81-87, 1991.