



Cryopreservation in liquid nitrogen of Brazilian orchid seeds *Miltonia flavescens* Lindl.¹

Criopreservação em nitrogênio líquido de sementes da orquídea brasileira *Miltonia flavescens* Lindl.

Jean Carlo Baudraz de Paula¹^{2*}, Walter Aparecido Ribeiro Júnior²², Gabriel Danilo Shimizu²², Gabriel Barraca Men³³, Ricardo Tadeu de Faria²²

Abstract: *Miltonia flavescens* is a species vulnerable to extinction, which justifies research on preservation methods. Cryopreservation in liquid nitrogen (LN) consists of maintaining biological material at a low-temperature (-196 °C). Thus, the aim of the experiment is to evaluate the influence of different cryoprotective solutions on cryopreservation in LN of the Brazilian orchid *Miltonia flavescens* seeds. The experiment was conducted in a completely randomized design (CRD), with eight treatments and six replications. The treatments were composed as follows: control; immersion in LN, no cryoprotectant adding; and immersion in LN, with the addition of cryoprotectants: sucrose 0,4 mol L⁻¹; glycerol 2 mol L⁻¹; protection by vitrification in solution (PVS)₁; PVS₂; PVS₂ + 1% phloroglucinol, and PVS₃. Except for the control treatment, which was kept in a freezer (10±2 °C), the others remained frozen for 15 days. After this period, the viability of the seeds was evaluated. These seeds were sown and, 30 days after germination, then the frequency of protocorm formation was verified. Before the cryopreservation, the seeds showed 75% viability and 9.5% water content. After cryopreservation, the seeds varied between 67 to 75% viability. However, treatment with glycerol 2 mol L⁻¹ exhibited lower performance than the others (58%). The control treatment showed a higher percentage of protocorm formation (71%) followed by treatments PVS₁ (63%), PVS₂ (64%), and PVS_{2PHLO} (66%). For the purpose of preserving *Miltonia flavescens* seeds in liquid nitrogen for a prolonged period, the treatments PVS₁, PVS₂, and PVS_{2PHLO} proved to be viable and promising alternatives.

Key words: Seed storage. Conservation. Orchidaceae.

Resumo: *Miltonia flavescens* é uma espécie vulnerável à extinção, o que justifica pesquisas sobre métodos de preservação. A criopreservação em nitrogênio líquido (NL) consiste em manter o material biológico a temperatura baixa (-196 °C). Assim, objetivou-se avaliar a influência de diferentes soluções crioprotetoras na criopreservação em NL de sementes da orquídea brasileira *Miltonia flavescens*. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com oito tratamentos e seis repetições. Os tratamentos foram compostos por: controle; imersão em NL, sem adição de crioprotetor; e imersão em NL, com adição dos crioprotetores: sacarose 0,4 mol L⁻¹; glicerol 2 mol L⁻¹; proteção por vitrificação em solução (PVS)₁; PVS₂; PVS₂ + 1% floroglucinol e PVS₃. Com exceção do tratamento controle, que permaneceu em refrigerador (10±2 °C), os demais permaneceram congeladas por 15 dias. Após esse período, foi avaliada a viabilidade das sementes. Essas sementes foram semeadas e, 30 dias após a germinação, foi verificada a frequência de formação de protocormos. Antes da criopreservação, as sementes apresentaram 75% de viabilidade e 9,5% de teor de água. Após a criopreservação, as sementes variaram entre 67 a 75% de viabilidade, exceto o tratamento com glicerol 2 mol L⁻¹ que teve desempenho inferior aos demais (58%). O tratamento controle apresentou maior percentual de formação de protocormos (71%) seguido dos tratamentos PVS₁ (63%), PVS₂ (64%) e PVS_{2FLO} (66%). Para fins de conservação de sementes de *Miltonia flavescens* em nitrogênio líquido por tempo prolongado, os tratamentos PVS₁, PVS₂ e PVS_{2FLO} são alternativas viáveis e promissoras.

Palavras-chave: Armazenamento de sementes. Conservação. Orchidaceae.

*Corresponding author

Submitted for publication on 06/05/2020, approved on 17/10/2020 and published on 27/11/2020

¹Artigo extraído de Projeto de Pesquisa.

²Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias (CCA), Departamento de Agronomia, Campus Universitário, CEP 86051-990, Londrina, PR, Brasil. E-mails: jc_baudraz@live.com; junior_agro40@hotmail.com; shimizu@uel.br; faria@uel.br

³Graduação em Agronomia. Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias (CCA), Departamento de Agronomia, Campus Universitário, CEP 86051-990, Londrina, PR, Brasil. E-mail: gabrielmen540@gmail.com

INTRODUCTION

Brazil is a center of a great orchid diversity, with about 2,420 species distributed across 207 genera (REFLORA, 2020). Orchids are of great commercial appeal, mainly for ornamental use, due to their beauty as well as ecological and botanical importance. Thus, it is widely cultivated worldwide, representing about 8% of the ornamental Plants in global market (CHUGH *et al.*, 2009).

Among the orchids, *Miltonia flavescens* Lindl stands out, a native species, but not endemic to Brazil, occurring in the states of the South, Southeast, Midwest, and Northeast (Bahia and Pernambuco), and on Caatinga, Cerrado, Atlantic Forest, and Pampa biomes (REFLORA, 2020). *Miltonia flavescens*, despite not being officially on the list of endangered species, is at risk due to the deforestation that affects its habitat and extractivism, whose occurrence is attributed to its great value in the market as an ornamental plant. Thus, studies are needed to enable the conservation of this species.

Orchid seeds are considered orthodox, capable of tolerating desiccation and long-term storage at low temperatures, in addition to tolerating low water contents (5 to 8%). Storage plays an important role in the long-term conservation of orchid species, as they require little storage space, facilitating the creation of germplasm banks at reduced costs (SALMITO-VANDERLEY *et al.*, 2014).

Cryopreservation is a conservation technique in which the biological material is kept at extremely low temperature (-196 °C), maintaining its characteristics after thawing. A strategy of this technique is the use of cryoprotective substances that prevent harmful effects on cells, such as the formation of intracellular ice crystals (ENGELMANN, 2011).

Cryoprotectants are important for seed survival during the cryopreservation process. The use of these substances induces a reduction in the freezing temperature in the formation of ice crystals, reducing and controlling the deleterious effects of the freezing and thawing process. The cryoprotectants generally adopted in cryopreservation protocols are dimethyl sulfoxide (DMSO), ethylene glycol (EG), glycerol, and sucrose.

The type of cryoprotectant, concentration, and exposure time of the material can result in a toxic effect, which requires knowing the mechanism of action and harmful effects these substances may cause (ARAÚJO *et al.*, 2019).

INTRODUÇÃO

O Brasil é um centro de grande diversidade das orquídeas, com 2.420 espécies distribuídas em 207 gêneros (REFLORA, 2020). As orquídeas são de grande apelo comercial, principalmente no uso ornamental, devido à sua beleza, além da importância ecológica e botânica. Desse modo, apresenta amplo cultivo pelo mundo, representando cerca de 8% do mercado mundial de plantas ornamentais (CHUGH *et al.*, 2009).

Entre as orquídeas, destaca-se a *Miltonia flavescens* Lindl, que é nativa, porém não endêmica do Brasil, com ocorrência nos estados do Sul, Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste (Bahia e Pernambuco) e nos biomas Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica e Pampa (REFLORA, 2020). *Miltonia flavescens*, apesar de não estar oficialmente na lista de espécies ameaçadas, corre riscos devido ao desmatamento de seu *habitat* e ao extrativismo, cuja ocorrência se deve ao seu grande valor no mercado como planta ornamental. Assim, são necessários estudos que possibilitem a conservação dessa espécie.

As sementes das orquídeas são ortodoxas, capazes de tolerar a dessecação e armazenamento a baixas temperaturas por longo período, além de tolerar teores baixos de água (5 a 8%). O armazenamento desempenha papel importante na conservação em longo prazo de espécies de orquídeas, pois requerem pouco espaço para o armazenamento, o que facilita a criação de bancos de germoplasma com custos reduzidos (SALMITO-VANDERLEY *et al.*, 2014).

A criopreservação é um método de preservação em que o material biológico é mantido a baixa temperatura (-196 °C) e mantém suas características após o descongelamento. Uma estratégia desta técnica é a utilização de substâncias crioprotetoras que previnem efeitos danosos nas células como, por exemplo, a formação de cristais de gelo (ENGELMANN, 2011).

Os crioprotetores são fundamentais para sobrevivência das sementes durante o processo de criopreservação. A utilização dessas substâncias provoca redução da temperatura de congelamento na qual os cristais de gelo são formados, minimizando e controlando os efeitos deletérios do processo de congelamento e descongelamento. Os crioprotetores mais comumente utilizados em protocolos de criopreservação são dimetilsulfóxido (DMSO), etileno glicol (EG), glicerol e a sacarose.

O tipo de crioprotetor, a concentração e o tempo de exposição do material podem resultar em efeito tóxico, o que requer conhecer o mecanismo de ação e efeitos danosos que essas substâncias possam causar (ARAÚJO *et al.*, 2019).

For minimizing the possible osmotic and toxic damages with the use of these substances, the combination of several cryoprotectants is adopted, such as protection by vitrification in solution (PVS), expanding its use in cryopreservation process (DENNISTON *et al.*, 2000).

The cryoprotectants have different mechanisms of action, being importance in the cryopreservation process. Based on that, this work aims at evaluating the influence of different cryoprotectant solutions on cryopreservation in liquid nitrogen of Brazilian orchid seeds *Miltonia flavescens*.

MATERIAL AND METHODS

The experiment was carried out at the Phytotechnics Laboratory/Department of Agronomy of the Londrina State University (Portuguese: Universidade Estadual de Londrina, UEL) between January and October 2019.

Miltonia flavescens seeds were obtained by artificial pollination of plants grown in a greenhouse. Pollination of orchids started after flower opening, favoring the establishment. Mature capsules were harvested seven months after pollination. The capsules were opened using a scalpel; part of the seeds was collected to perform the tetrazolium test and water content before freezing, and another part was used for the study of cryopreservation.

The water content of these seeds was determined according to the specifications of the Rules for Seed Analysis (BRASIL, 2009). For performing the tetrazolium test, the seeds were placed in a cryotube (2 mL) containing distilled water for 24 h at 25 °C in a BOD chamber (Biochemical oxygen demand). Then, the water was removed, and the 1% tetrazolium salt solution was added. The seeds remained for 24 h in BOD under a temperature of 30 °C and, with the aid of a stereoscopic magnifying glass and the Motic Images Plus 2.0ML software, it was possible to evaluate the seed viability. For calculating the percentage of viable seeds, empty seeds were not considered, that is, those that did not have an embryo.

The experimental design adopted was completely randomized with 8 treatments and 10 repetitions. The treatments were: 1) Control (CON), use of refrigeration (10 ± 2 °C); 2) liquid nitrogen immersion (LNI); 3) LNI with the addition of cryoprotectants sucrose 0.4 mol L^{-1} (LNI_{SUC}); 4) LNI plus glycerol (LNI_{GLYC}); 5) LNI and protection by vitrification in solution (PVS)₁; 6) PVS₂; 7) PVS₂ + 1% phloroglucinol (PVS_{2PHLO}); and 8) PVS₃.

Para minimizar os possíveis danos osmóticos e tóxicos com o uso dessas substâncias, faz-se o uso combinado de vários crioprotetores, como as soluções de vitrificação de plantas (SVP), o que as tornam muito utilizadas no processo de criopreservação (DENNISTON *et al.*, 2000).

Em decorrência dos diferentes mecanismos de ação dos crioprotetores e sua importância na criopreservação, objetivou-se avaliar a influência de diferentes soluções crioprotetoras na criopreservação em nitrogênio líquido de sementes da orquídea brasileira, *Miltonia flavescens*.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Fitotecnia/Departamento de Agronomia da Universidade Estadual de Londrina entre janeiro e outubro de 2019.

As sementes de *Miltonia flavescens* foram obtidas por polinização artificial de plantas cultivadas em estufa. A polinização das orquídeas se deu dois dias após a abertura da flor, para favorecer o pegamento, e as cápsulas maduras foram colhidas sete meses após a polinização. As cápsulas foram abertas usando bisturi, parte das sementes foi coletada para a realização do teste de tetrazólio e teor de água antes do congelamento, e outra parte utilizada para o estudo da criopreservação.

O teor de água dessas sementes foi determinado conforme especificações das Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009). O teste de tetrazólio foi realizado colocando as sementes em criotubo (2 mL) contendo água destilada por 24 h a 25 °C em câmara de BOD (*Biochemical oxygen demand*). Em seguida, a água foi retirada e adicionada a solução de sal tetrazólio a 1%. As sementes permaneceram por 24 h em BOD sob temperatura de 30 °C e, com auxílio de lupa estereoscópica e do software Motic Images Plus 2.0ML, foi possível avaliar a viabilidade das sementes. Para o cálculo da porcentagem de sementes viáveis, não foram consideradas as sementes vazias, ou seja, aquelas que não apresentavam embrião.

Para a condução do experimento, empregou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado com 8 tratamentos e 10 repetições. Os tratamentos foram: 1) controle (CON), uso de refrigeração (10 ± 2 °C); 2) imersão em nitrogênio líquido (INL); 3) INL mais crioprotetor sacarose $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ (INL_{SAC}); 4) INL mais glicerol (INL_{GLIC}); 5) INL e proteção por vitrificação em solução (PVS)₁; 6) PVS₂; 7) PVS₂ + 1% floroglucinol (PVS_{2FLO}); e 8) PVS₃.

For each treatment, 2 mL cryotubes with 5 mg of seeds were used. The cryotubes, from the control treatment, were stored in a refrigerator (10 ± 2 °C). In treatments with cryoprotectants glycerol 2 mol L^{-1} and sucrose 0.4 mol L^{-1} , cryotubes received 2 mL of the different solutions, 20 minutes at room temperature (25 ± 2 °C); and then immersed in LN. In the treatments PVS₁, PVS₂, PVS₂ + 1% phloroglucinol, and PVS₃, the seeds were exposed to the vitrifying solutions for 20 minutes in an ice bath (0 °C) and later immersed in LN.

PVS (protection by vitrification in solution) has three formulations, being: PVS₁ - 19% glycerol (v/v), 13% ethylene glycol (v/v), 6% DMSO (v/v) and sorbitol $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ in $\frac{1}{2}$ MS medium (SAKAI *et al.*, 1990); PVS₂ - 30% glycerol (v/v), 15% ethylene glycol (v/v), 15% DMSO (v/v) and sucrose 0.4 mol L^{-1} in $\frac{1}{2}$ MS medium (VENDRAME; FARIA, 2011); and PVS₃ - 50% glycerol (v/v) and 50% sucrose (v/v) in distilled water (TEIXEIRA *et al.*, 2014). All solutions were prepared by taking a volume of 100 mL.

Cryotubes immersed in liquid nitrogen, at a temperature of -196 °C, remained for 15 days. After that period, they were defrosted in a water bath, under a temperature of 40 °C for 90 seconds (Evlab model EV: 015 equipment with 0.1 °C precision).

In a laminar flow chamber, the cryoprotectant solutions were removed from the cryotubes with the aid of a Pasteur pipette, then added 2 mL of 1 mol L^{-1} sucrose solution for 20 minutes. Subsequently, 0.5 mL of this solution was removed, and the volume was completed with 0.1 mol L^{-1} sucrose solution for an additional time of 5 minutes. In the end, the seeds were washed three times with distilled water.

Half of the sample of seeds obtained from the cryotube was subjected to the tetrazolium test after freezing. The remainder was rehydrated and sterilized in sodium hypochlorite solution (0.6% active chlorine) for 20 minutes, washed three times with distilled and autoclaved water. After sterilization, the seeds were deposited in Petri dishes holding MS culture medium (MURASHIGE; SKOOG, 1962), contains half the concentration of macronutrients, the addition of 30 g L^{-1} of sucrose and 7 g L^{-1} of agar, and adjusted pH to 5.8. This medium was previously placed in an autoclave at a pressure of 1.05 kgf cm^{-2} and a temperature of 120 °C for 30 minutes and distributed in Petri dishes (20 mL per plate) under a laminar flow chamber. For each treatment, 6 plates were used.

Para cada tratamento, empregou-se criotubos de 2 mL com 5 mg de sementes. Os criotubos, do tratamento controle, foram acondicionados em refrigerador (10 ± 2 °C). Nos tratamentos com os crioprotetores glicerol 2 mol L^{-1} e sacarose $0,4 \text{ mol L}^{-1}$, os criotubos receberam 2 mL das diferentes soluções, 20 minutos à temperatura ambiente (25 ± 2 °C) e, depois, imersas em NL. Nos tratamentos PVS₁, PVS₂, PVS₂ + 1% de floroglucinol e PVS₃, as sementes foram expostas às soluções vitrificantes por 20 minutos em banho de gelo (0 °C) e, em seguida, imersas em NL.

O PVS (proteção por vitrificação em solução) apresenta três formulações, sendo: PVS₁ - 19% de glicerol (v/v), 13% de etilenoglicol (v/v), 6% de DMSO (v/v) e sorbitol $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ em meio $\frac{1}{2}$ MS (SAKAI *et al.*, 1990); PVS₂ - 30% de glicerol (v/v), 15% de etilenoglicol (v/v), 15% de DMSO (v/v) e sacarose $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ em meio $\frac{1}{2}$ MS (VENDRAME; FARIA, 2011); e PVS₃ - 50% glicerol (v/v) e 50% sacarose (v/v) em água destilada (TEIXEIRA *et al.*, 2014). Todas as soluções foram preparadas tomando-se um volume de 100 mL.

Os criotubos imersos em nitrogênio líquido, sob temperatura de -196 °C, permaneceram por 15 dias. Após esse período, foram descongelados em banho-maria, sob temperatura de 40 °C durante 90 segundos (equipamento da marca Evlab modelo EV: 015 com precisão de $0,1$ °C).

Em câmara de fluxo laminar, as soluções crioprotetoras foram removidas dos criotubos com o auxílio de pipeta de Pasteur, em seguida adicionada 2 mL de solução de sacarose 1 mol L^{-1} por 20 minutos e, posteriormente, retirado 0,5 mL desta solução e completando o volume com solução de sacarose $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ por mais 5 minutos. Ao término, as sementes foram lavadas com água destilada três vezes.

Metade da amostra de sementes obtidas do criotubo foi submetida ao teste de tetrazólio após o congelamento. O restante foi reidratada e esterilizada em solução de hipoclorito de sódio (0,6 % de cloro ativo) por 20 minutos, lavadas por três vezes com água destilada e autoclavada. Após a esterilização, as sementes foram depositadas em placas de Petri contendo meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), com metade da concentração de macronutrientes, adição de 30 g L^{-1} de sacarose e 7 g L^{-1} de ágar e pH ajustado para 5,8. Esse meio foi previamente autoclavado a uma pressão de $1,05 \text{ kgf cm}^{-2}$ e temperatura de 120 °C por 30 minutos, e distribuído nas placas de Petri (20 mL por placa) sob câmara de fluxo laminar. Foram utilizadas 6 placas para cada tratamento.

Plates containing seeds were kept in a growth room, under 16-h photoperiod and irradiance of $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, at a temperature of $25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$. After 30 days, seed germination was evaluated using the frequency of protocorm formation with the aid of a magnifying glass. The initial presence of rhizoid and stem apex were considered protocorms.

The data obtained were submitted to analysis of variance (ANOVA), and the means compared by the Scott-Knott test at 5% probability of error, using the R software (R CORE TEAM, 2020).

RESULTS AND DISCUSSION

In the evaluation carried out to characterize the seed batch after opening the capsule, *Miltonia flavescens* seeds showed 75% viability and 9.5% water content before the cryopreservation in liquid nitrogen. It is recommended that the water content is below 10% before freezing the material (SILVA *et al.*, 2011), a value observed for seeds of the species under study.

The viability of the collected seeds was 75%; it is worth mentioning that factors such as high post-harvest temperatures ($30 \text{ }^\circ\text{C}$) and maturity (PARDO; FERREIRA, 2006) can affect the viability of the seeds.

For the variables analyzed, seed viability (%) and protocorm formation (%), there was a statistical difference between treatments (Table 1).

As placas contendo as sementes foram mantidas em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 h luz, e irradiância de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ sob temperatura de $25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$. Após 30 dias, a germinação das sementes foi avaliada por meio da frequência da formação de protocormos, com o auxílio de lupa. Foram considerados protocormos a presença inicial de rizóides e de ápice caulinar.

Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância (ANOVA), e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro, por meio do software R (R CORE TEAM, 2020).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na avaliação realizada para caracterizar o lote das sementes após a abertura da cápsula, as sementes de *Miltonia flavescens* apresentaram 75% de viabilidade e 9,5% de teor de água antes de passar pelo processo de criopreservação em nitrogênio líquido. Recomenda-se que o teor de água esteja abaixo de 10% antes de congelar o material (SILVA *et al.*, 2011), valor observado para sementes da espécie em estudo.

A viabilidade das sementes coletadas estava em 75%, sendo que fatores como altas temperaturas pós-colheita ($30 \text{ }^\circ\text{C}$) e maturidade (PARDO; FERREIRA, 2006) podem afetar a viabilidade das sementes.

Para as variáveis analisadas, viabilidade de sementes (%) e formação de protocormos (%), houve diferença estatística entre os tratamentos (Tabela 1).

Table 1 - Average square of the variables: viable seeds and protocorms

Tabela 1 - Quadrado médio das variáveis Sementes viáveis e protocormos

FV	GL	Viable seeds	Protocorms formation
Treatment	7	205,631**	326,01**
Residue	40	16,414	13,29
Total	48		
CV	-	5,95	5,18

**Significant at 1% by the F-test; CV - Coefficient of variation.

**Significativo a 1% pelo teste F; CV - Coeficiente de variação.

For seed viability, the best results were obtained in the CON (75%), PVS₂ (72%), and PVS_{2PHLO} (74%) treatments (Figure 1).

Para a viabilidade das sementes, os melhores resultados foram obtidos nos tratamentos CON (75%), PVS₂ (72%) e PVS_{2FLO} (74%) (Figura 1).

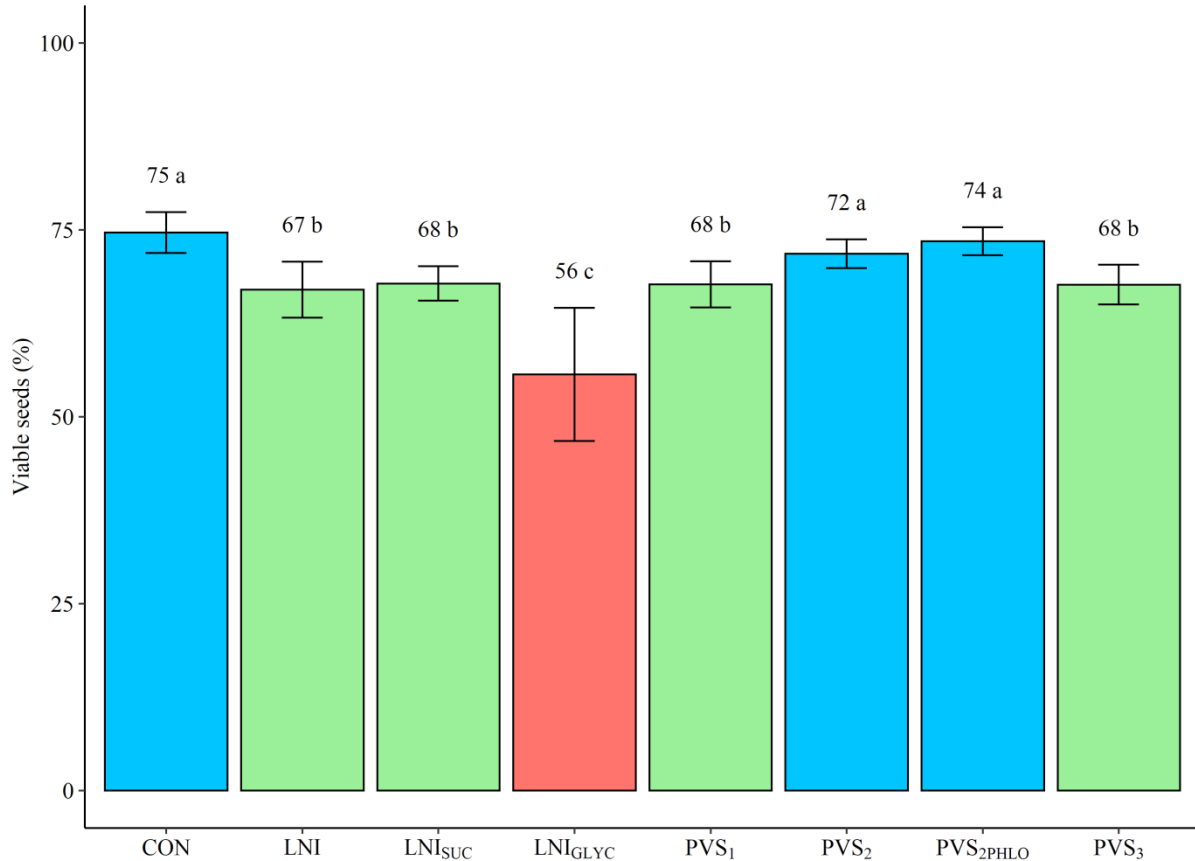


Figure 1 - Percentage of viable seeds of *Miltonia flavescens* 15 days after storage. Londrina/PR, 2020.

*Averages followed by the same letter do not differ from each other by the Scott-Knott test ($p \leq 0.05$).

**CON - Control; LNI - liquid nitrogen immersion; LNI_{SUC} - sucrose 0,4 mol L⁻¹; LNI_{GLYC} - glycerol 2 mol L⁻¹; PVS₁ - protection by vitrification in solution; PVS₂; PVS_{2PHLO} protection by vitrification in solution + 1% (v/v) phloroglucinol; PVS₃ - protection by vitrification in solution.

Figura 1 - Percentual de sementes viáveis de *Miltonia flavescens* 15 dias após o armazenamento. Londrina/PR, 2020.

*Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0.05$).

**CON - Controle; INL - Imersão em nitrogênio líquido; INL_{SAC} - sacarose 0,4 mol L⁻¹; INL_{GLIC} - glicérol 2 mol L⁻¹; PVS₁ - plant vitrification solution ; PVS₂; PVS_{FLO} plant vitrification solution + 1% (v/v) floroglucinol ; PVS₃ - plant vitrification solution.

According to Figure 1, there was a reduction in seed viability in the LNI (67%), LNI_{SUC} (68%), PVS₁ (61%), and PVS₃ (68%) treatments. The results exhibited that treatment with the cryoprotectant LNI_{GLYC} reduced the viability of the seeds to 56%. Although cryoprotectants are broadly used in cryopreservation, the mechanisms that protect the biological material, as well as the toxicity and cellular metabolism of these agents, have not been fully understood, especially concerning the cryopreservation of orchids (SUSUKI *et al.*, 2018).

Conforme Figura 1, houve redução da viabilidade das sementes nos tratamentos INL (67%), INL_{SAC} (68%), PVS₁ (61%) e PVS₃ (68%). O tratamento com o crioprotetor INL_{GLIC} reduziu a viabilidade das sementes para 56%. Embora os crioprotetores sejam amplamente utilizados na criopreservação, os mecanismos que conferem proteção ao material biológico, bem como a toxicidade e a metabolização celular destes agentes não são totalmente esclarecidos, principalmente quando se trata da criopreservação de orquídeas (SUSUKI *et al.*, 2018).

During the study, the effect of treatments on the formation of protocorms was also evaluated. In Figure 2, the initial phase of the orchid seed germination process is presented. This process begins with the expansion of the seed by the water absorption, followed by the rupture of the integument and release of the embryo. The embryo develops in a chlorophyll and tuberiform structure (A), characterizing the protocorm, which will later develop into a seedling (B) (ROY *et al.*, 2011).

Na avaliação do efeito dos tratamentos na formação de protocormos, destacou-se por meio da Figura 2 a fase inicial do processo de germinação de semente de orquídea. Esse processo se inicia com a dilatação da semente pela absorção de água, seguido do rompimento do tegumento e liberação do embrião. O embrião se desenvolve em uma estrutura clorofilada e tuberiforme (A), caracterizando o protocormo, que posteriormente irá se desenvolver e originar uma plântula (B) (ROY *et al.*, 2011).

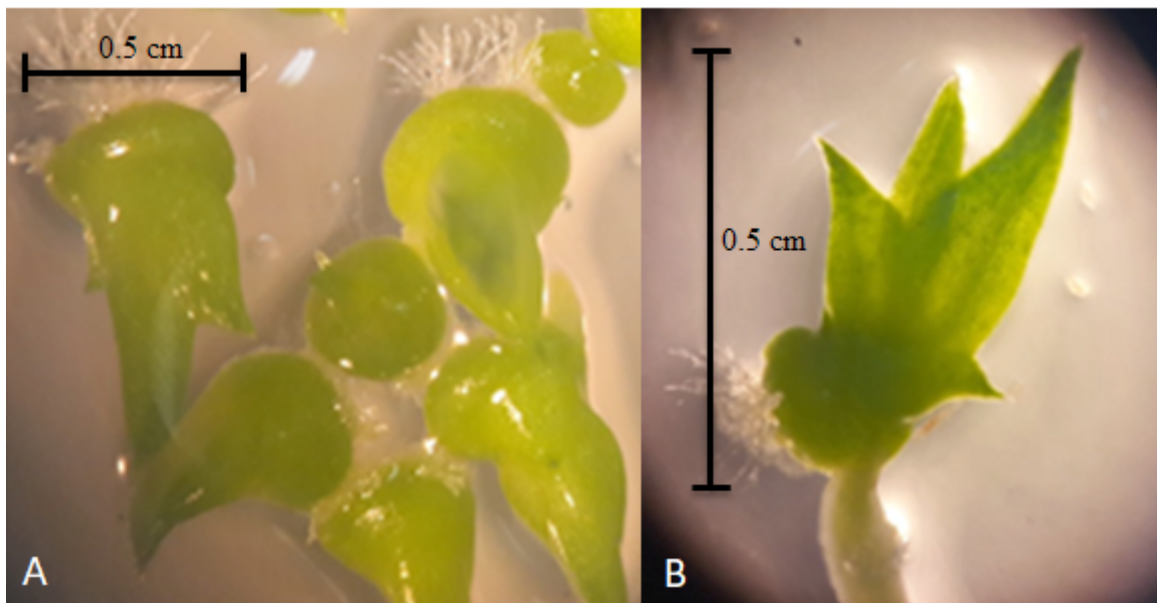


Figure 2 - Development of protocorms (A) 30 days after germination and seedlings (B) of *Miltonia flavescens* in culture medium.

Source: Authors (2020).

Figura 2 - Surgimento dos protocormos (A) 30 dias após a germinação e plântulas (B) de *Miltonia flavescens* em meio de cultura.

Fonte: Os autores.

In the evaluation of protocorm formation (Figure 3), the results demonstrated that the control treatment (CON) showed a higher percentage of germination with 71%. Moreover, it was observed the negative effect caused by the viability of the seed by glycerol (LNI_{GLYC}), showing a reduction to 46% of germination.

The negative result from the glycerol effect may be related to the fact that, among the cryoprotectants used, glycerol is capable of presenting greater toxicity in cells, affecting, thus, membrane fluidity and protein denaturation (ALVARENGA *et al.*, 2005).

There was no difference between the treatments PVS₁ (63%), PVS₂ (64%), and PVS_{2PHLO} (66%) in the protocorms formation (Figure 3), being superior to the other treatments with cryoprotectants.

Na avaliação de formação de protocormos (Figura 3), verifica-se que o tratamento controle (CON) apresentou maior percentual de germinação com 71%, observa-se também que o efeito negativo causado na viabilidade da semente pelo glicerol (INL_{GLIC}) é confirmado, com redução para 46% de germinação.

O resultado negativo do efeito do glicerol pode estar relacionado ao fato de que, entre os crioprotetores utilizados, o glicerol é capaz de apresentar toxicidade maior nas células, afetando a fluidez da membrana e desnaturação de proteínas (ALVARENGA *et al.*, 2005).

Não houve diferença entre os tratamentos PVS₁ (63%), PVS₂ (64%) e PVS_{2FLO} (66%) na formação de protocormos (Figura 3), sendo superiores aos demais tratamentos com crioprotetores.

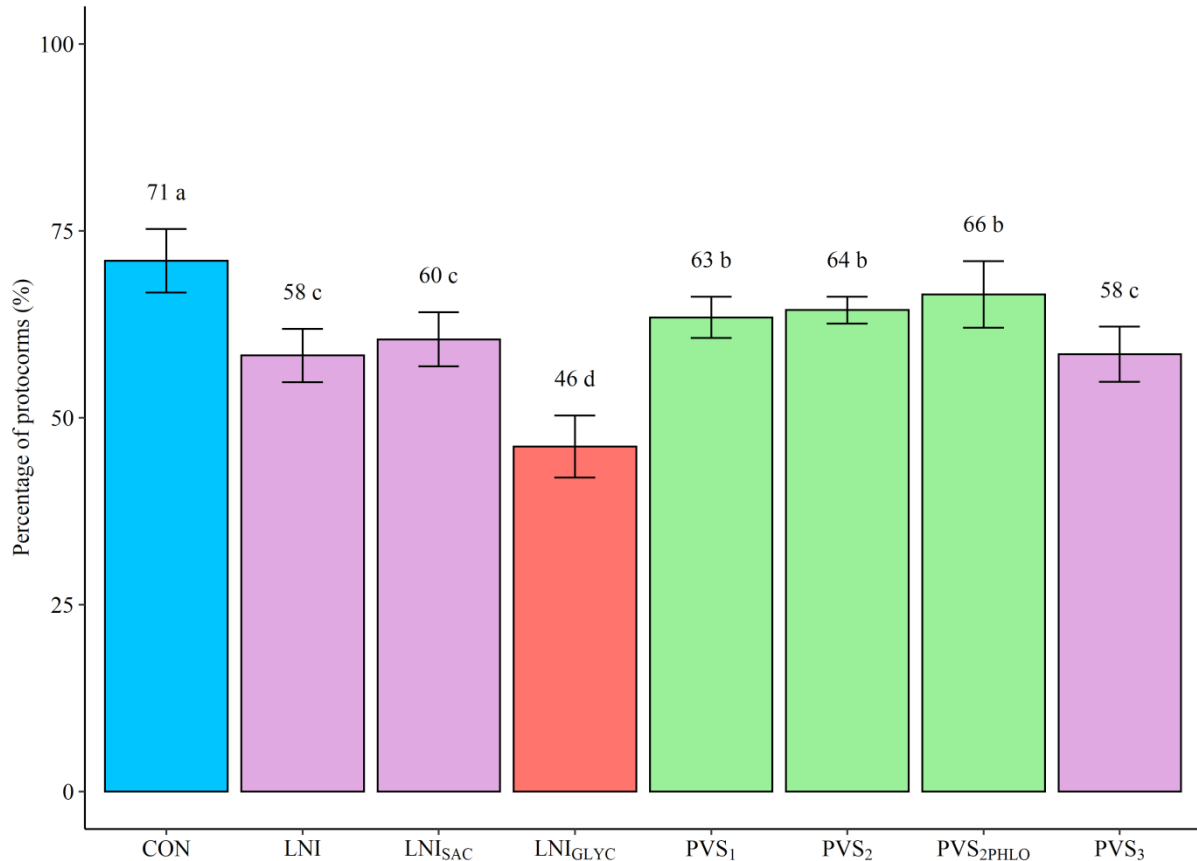


Figure 3 - Percentage of protocorms formation obtained 30 days after germination in MS culture medium (Murashige; Skoog, 1962). Londrina/PR, 2020.

*Averages followed by the same letter do not differ from each other by the Scott-Knott test ($p \leq 0.05$).

**CON - Control; LNI - liquid nitrogen immersion; LNI_{SUC} – sucrose 0,4 mol L⁻¹; LNI_{GLYC} – glycerol 2 mol L⁻¹; PVS₁ - protection by vitrification in solution; PVS₂; PVS_{2PHLO} protection by vitrification in solution + 1% (v/v) phloroglucinol; PVS₃ - protection by vitrification in solution.

Figura 3 - Percentual de formação de protocormos obtidos 30 dias após a germinação em meio de cultura MS (Murashige; Skoog, 1962). Londrina/PR, 2020.

*Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0.05$).

**CON - Controle; INL - Imersão em nitrogênio líquido; INLSAC – sacarose 0,4 mol L⁻¹; INLGLIC – glicerol 2 mol L⁻¹; PVS₁ - plant vitrification solution ; PVS₂; PVS_{2PHLO} plant vitrification solution + 1% (v/v) floroglucinol ; PVS₃ - plant vitrification solution.

Cryoprotectants are substances that reduce the damage suffered by the cell during the freezing and thawing steps. In the literature, vitrification solutions are reported as a successful method for cryopreservation; however, it is important to note that vitrification solutions have toxic effects for many plants, which requires careful treatment (VENDRAME; FARIA, 2011).

Os crioprotetores são substâncias que reduzem a injúria sofrida pela célula durante as etapas de congelamento e descongelamento. Na literatura, as soluções de vitrificação são relatadas como um método bem sucedido para a criopreservação, no entanto, é importante ressaltar que soluções de vitrificação apresentam efeitos tóxicos para muitas plantas, o que requer um tratamento cuidadoso (VENDRAME; FARIA, 2011).

The substances present in these solutions have different mechanisms. Dimethylsulfoxide (DMSO), for example, prevents a water crystallization and acts to remove free radicals released during the thawing process. Ethylene glycol has a similar function to DMSO (SUSUKI *et al.*, 2018). Sucrose and sorbitol are sugars that, according to studies with absorption by the freezing point cells, are lowered and the amount of freezing water in the tissues decreases, reducing the formation of ice crystals (PANIS *et al.*, 1996).

Nevertheless, it is emphasized that for the total effectiveness of the process adjustments, are necessary, for example, to get a concentration on these solutions. Glycerol has an effect as a cryoprotectant, although in certain concentrations it can lead to toxicity, it did not appear harmful when added with other substances. While PVS₃ solution, which had a higher concentration of glycerol (50%), may have led to some damage, indicating that adjustments regarding concentration or exposure time are necessary.

It is interesting to comprehend that the stress caused by freezing associated with the use of cryoprotectants may have caused the interruption and disruption of some metabolic processes. It is also possible that the damage observed in cryopreservation may have been caused by a loss of cell integrity due to the formation of ice crystals (MOLINA *et al.*, 2006). Perhaps this could explain the germination reduction in treatments submitted to freezing.

Thus, it is noted that the cryopreservation technique depends on a complex interaction between several variables such as the volume and composition of the cryopreservation solution as well as the cooling rates (SUSUKI *et al.*, 2018).

CONCLUSION

Our results demonstrated that PVS₁, PVS₂, PVS_{2PHLO} and PVS₃ treatments, used for long-term conservation, are viable and promising alternatives in the maintenance of *Miltonia flavescens* seeds in liquid nitrogen (-196 °C).

ACKNOWLEDGMENT

The Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES) for the scholarship given to the first author (n° 88882.448347/2019-01); the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq for financial support to the third author (n° 141699/2020-5) and to the last author (n° 301684/2017-0); and the Universidade Estadual de Londrina (UEL).

As substâncias presentes nestas soluções possuem mecanismos diferentes. O dimetilulfóxido (DMSO) por exemplo, evita a cristalização da água e atua na remoção dos radicais livres liberados durante o processo de descongelamento. O etilenoglicol tem função semelhante ao DMSO (SUSUKI *et al.*, 2018). A sacarose e o sorbitol são açúcares que segundo estudos com a absorção pelas células ponto de congelamento é abaixado e a quantidade de água livre congelável nos tecidos decresce, reduzindo a formação de cristais de gelo (PANIS *et al.*, 1996).

No entanto, ressalta-se que para a total eficácia do processo são necessários ajustes, por exemplo, de concentração dessas soluções. O glicerol tem seu efeito como crioprotetor, no entanto, determinadas concentrações podem levar a toxicidade, porém sua adição com outras substâncias não pareceu ser prejudicial. Já a solução de PVS₃ que teve maior concentração de glicerol (50%) pode ter levado a algum dano, indicando ser necessário ajustes quanto à concentração ou ao tempo de exposição.

O estresse provocado pelo congelamento associado ao uso dos crioprotetores pode ter causado a interrupção e desestruturação de alguns processos metabólicos, ou também é possível que os danos observados na criopreservação possam ter sido causados pela perda da integridade celular devido à formação de cristais de gelo (MOLINA *et al.*, 2006). Isso pode explicar a redução da germinação nos tratamentos submetidos ao congelamento.

Com isso, nota-se que a técnica da criopreservação depende de uma complexa interação entre diversas variáveis como o volume da solução de criopreservação e taxas de resfriamento, bem como à composição da solução de criopreservação (SUSUKI *et al.*, 2018).

CONCLUSÃO

Os tratamentos PVS₁, PVS₂, PVS_{2FLO} e PVS₃, visando à conservação por tempo prolongado, são alternativas viáveis e promissoras na manutenção de sementes de *Miltonia flavescens* em nitrogênio líquido (-196°C).

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa cedida ao primeiro autor (n° 88882.448347/2019-01); ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro ao terceiro autor (n° 141699/2020-5) e ao último autor (n° 301684/2017-0); e à Universidade Estadual de Londrina (UEL).

CITED SCIENTIFIC LITERATURE

- ALVARENGA, M. A.; PAPA, F. O.; LANDIM-ALVARENGA, F. C.; MEDEIROS, A. S. Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: a review. **Animal Reproduction Science**, v. 89, n. 1-4, p. 105-113, 2005. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.07.001>
- ARAÚJO, D. S.; SOARES, F. S.; SOBRINHO, S. P.; LUZ, P. B. Crioprotetores na criopreservação de sementes de *Passiflora mucronata* Lam. **Iheringia, Série Botânica**, v. 74, p. e2019008, 2019. DOI: <https://doi.org/10.21826/2446-82312019v74e2019008>
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília: Mapa/ACS. 2009. 399 p.
- CHUGH, S.; GUHA, S.; RAO, U. Micropropagation of orchid: a review on the potential of different explants. **Scientia Horticulturae**, v. 122, n. 4, p. 507-520, 2009. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.scienta.2009.07.016>
- DENNISTON, R. S.; MICHELET, S.; GODKE, R. Principles of cryopreservation. In: TIERSCH, T. R.; MAZIK, P. M. Cryopreservation in aquatic species. **World Aquaculture Society**, p. 59-74, 2000.
- ENGELMANN, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 47, n. 1, p. 5-16, 2011. DOI: <http://doi.org/10.1007/s11627-010-9327-2>
- MOLINA, T. F.; TILLMANN, M. A. A.; DODE, L. B.; VIÉGAS, J. Crioconservação em sementes de cebola. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 28, n. 3, p. 72-81, 2006.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 5, n. 3, p. 473-497, 1962. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- PANIS, B.; TOTTE, N.; NIMMÉN, K. V.; WITHERS, L. A.; SWENNEN, R. Cryopreservation of banana (*Musa* spp.) meristem cultures after pre-culture on sucrose. **Plant Science**, v. 121, n. 1, p. 95-106, 1996. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(96\)04507-4](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(96)04507-4)
- PARDO, V. A.; FERREIRA, A. G. Armazenamento de sementes de orquídeas. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 28, n. 1, p. 92-98, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0101-31222006000100013>
- R CORE TEAM. R. 2020. **A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. Disponível em: <http://www.r-project.org>. Acesso em: 08 jan.2020.
- REFLORA. **Bromeliaceae in Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB66> . Acesso em: 12 jan. 2020.
- ROY, A. R.; PATEL, R. S.; PATEL, V. V.; SAJEEV, S.; DEKA, B. C. Asymbiotic seed germination, mass propagation and seedling development of *Vanda coerulea* Griff ex. Lindl. (Blue Vanda): An in vitro protocol for an endangered orchid. **Scientia Horticulturae**, v. 128, n. 3, p. 325-331, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.01.023>
- SAKAI, A.; KOBAYASHI, S.; OIYAMA, I. Cryopreservation of nucellar cell of navel orange (*Citrus sinensis* Obs. var. *Brasiliensis* Tanaka) by vitrification. **Plant Cell**, v. 9, n. 1, p. 30-33, 1990. DOI: <http://doi.org/10.1007/BF00232130>
- SALMITO-VANDERLEY, C. S. B.; PINHEIRO, J. P. S.; ALMEIDA, P. S.; LOPES, J. T.; LEITE, L. V. Metodologias para criopreservação e mecanismos de avaliação de sêmen de peixes characiformes. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 8, p. 343-350, 2014. DOI: <http://doi.org/10.21708/avb.2014.8.0.3951>
- SILVA, R. C.; CAMILLO, J.; LUIS, Z. G.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Potencial germinativo e morfoanatomia foliar de plântulas de pinhão manso originadas de germoplasma criopreservado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, p. 836-844, 2011.
- SUSUKI, A. B. P.; BERTONCELLI, D. J.; ALVES, G. A. C.; FARIA, R. T. Criopreservação de sementes da orquídea brasileira em extinção *Cattleya granulosa* Lindl. **Iheringia, Série Botânica**, v. 73, n. 2, p. 146-150, 2018. DOI: <http://doi.org/10.21826/2446-8231201873206>

TEIXEIRA, A. S.; FALTUS, M.; ZAMECNIK, J.; BENITO, G. M. E.; GARCIA, M. A. D. Glass transition and heat capacity behaviors of plant vitrification solutions. **Thermochimica Acta**, v. 593, p. 43-49, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1021/j100677a022>

VENDRAME, W. A.; FARIA, R. T. Phloroglucinol enhances recovery and survival of cryopreserved *Dendrobium nobile* protocorms. **Scientia Horticulturae**, v. 128, p. 131-135, 2011.