

CRIOPRESERVAÇÃO DE ORQUÍDEAS BRASILEIRAS  
DO GÊNERO *Cattleya*

**RENATO GOBBI VETTORAZZI**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE  
DARCY RIBEIRO - UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
FEVEREIRO - 2020

CRIOPRESERVAÇÃO DE ORQUÍDEAS BRASILEIRAS  
DO GÊNERO *Cattleya*

**RENATO GOBBI VETTORAZZI**

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e  
Tecnologias Agropecuárias da Universidade  
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,  
como parte das exigências para obtenção do  
título de Doutor em Genética e Melhoramento  
de Plantas”

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Virginia Silva Carvalho

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
FEVEREIRO – 2020

### FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pelo autor.

V592

Vettorazzi, Renato Gobbi.

Criopreservação de orquídeas brasileiras do gênero *Cattleya* / Renato Gobbi Vettorazzi. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2020.

118 f. : il.

Bibliografia: 80 - 93.

Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2020.  
Orientadora: Virginia Silva Carvalho.

1. Orchidaceae. 2. Banco Criogênico. 3. Vitrificação. 4. Manutenção da Diversidade. 5. Conservação de Germoplasma. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 631.5233

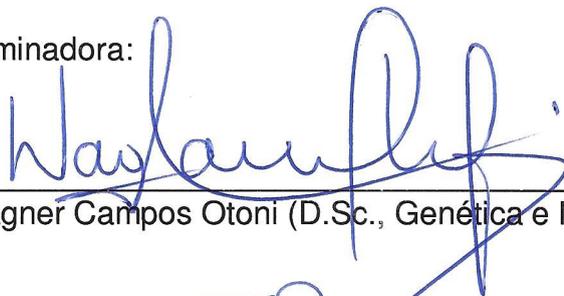
CRIOPRESERVAÇÃO DE ORQUÍDEAS BRASILEIRAS  
DO GÊNERO *Cattleya*

**RENATO GOBBI VETTORAZZI**

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e  
Tecnologias Agropecuárias da Universidade  
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,  
como parte das exigências para obtenção do  
título de Doutor em Genética e Melhoramento de  
Plantas”

Aprovada em 18 de fevereiro de 2020.

Comissão Examinadora:



---

Prof. Wagner Campos Otoni (D.Sc., Genética e Melhoramento) - UFV



---

Prof.ª Telma Nair Santana Pereira (Ph.D., Melhoramento de Plantas) - UENF



---

Prof.ª Claudete Santa Catarina (D.Sc., Biotecnologia) - UENF



---

Prof.ª Virginia Silva Carvalho (D.Sc., Fitotecnia) - UENF  
(Orientadora)

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela proteção, graças e bênçãos concedidas;

À minha esposa Milena, por não medir esforços em ajudar, pelo companheirismo, carinho, paciência, compreensão e, sobretudo, pelo amor sempre presente;

À minha família, pelas orações e por me fazer uma pessoa digna. Em especial, a meus pais Jorge e Maria da Penha e minha irmã Rosana, pela paciência, incentivo, força, carinho, dedicação e por me permitirem chegar aonde cheguei;

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, pela estrutura e oportunidade de qualificação;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de doutorado nos dois primeiros anos;

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001;

À Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), pela concessão da bolsa de doutorado nota 10;

À professora Virginia Silva Carvalho, pela orientação, amizade, apoio, incentivo e confiança;

Às professoras conselheiras, Rosana Rodrigues e Telma Nair Santana Pereira, pelos ensinamentos e valiosas sugestões;

Ao professor Eliemar Campostrini, pelo auxílio com os dados fisiológicos, e à professora Maura da Cunha, pelo auxílio com as análises anatômicas;

Ao professor Lyderson Facio Viccini e ao Dr. Elyabe Monteiro de Matos, da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), pelo auxílio com a citometria de fluxo;

Ao Sávio Caliman e ao seu irmão Cleto Caliman, o “Keko”, por colocarem o orquídeo à disposição para que as plantas fossem polinizadas e pela doação das cápsulas para a condução dos experimentos;

Aos professores do curso, que contribuíram positivamente para a minha formação acadêmica, pela oportunidade de aprendizagem, confiança e incentivo;

À professora Claudete Santa Catarina, por todas as suas contribuições e pela disponibilidade de participação na banca;

Ao professor Wagner Campos Otoni, pela disponibilidade de participação na banca;

A todos os funcionários da UENF, em especial ao Daniel, pela paciência e informações quanto aos prazos e datas;

Aos colegas de laboratório, em especial, Andressa Leal Generoso, Clarissa Ribeiro Baptista, Lidiane Miranda da Silva, Naiara Lopes Brito, Otávio Damásio da Costa Júnior, Rafael Walter, Roberta Aparecida de Sales, Roberto Rivelino do Nascimento Barbosa e Vinicius de Freitas Manhães, pelo auxílio e por todos os momentos de descontração vividos durante a condução dos trabalhos;

Ao meu primo Julio Cesar, amigo, colega de curso e de república, pela amizade e paciência durante esses anos;

Aos amigos Jéssica Moraes Cunha e Júlio Féres, pelos momentos de descontração; e

Enfim, a todos que, de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho, meu muito obrigado.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Protocolo de criopreservação pelo método de vitrificação (Fotos do autor).....15
- Figura 2.** Protocolo de criopreservação pelo método de desidratação (Fotos do autor).....16
- Figura 3.** Aspecto morfológico das cápsulas do (A) híbrido *C. harrisoniana* x *C. walkeriana*, (B) *C. tigrina* e (C) *C. guttata* utilizadas no experimento. Barras = 1,0 cm. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.....22
- Figura 4.** Aspecto morfológico das sementes do (A) híbrido *C. harrisoniana* x *C. walkeriana*, (B) *C. tigrina* e (C) *C. guttata* coradas pelo método do tetrazólio. Barras = 0,1 mm (A e C) e 0,5 mm (B). Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.....22
- Figura 5.** Aspecto morfológico das cápsulas de *C. amethystoglossa* utilizadas no experimento. (A) Cápsula 1 - Sementes com teor de água de 67,9%; (B) Cápsula 2 - Sementes com teor de água de 49,4%; (C) Cápsula 3 - Sementes com teor de água de 33,0%. Barras = 1,0 cm. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.....23
- Figura 6.** Aspecto morfológico das cápsulas de *C. loddigesii* utilizadas no experimento. (A) Cápsula 1 - Sementes com teor de água de 55,9%; (B) Cápsula

2 - Sementes com teor de água de 23,8%. Barras = 1,0 cm. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.....24

**Figura 7.** Aspecto morfológico das sementes de *C. loddigesii* utilizadas no experimento, coradas pelo método do tetrazólio. (A) Sementes da cápsula 1, com teor de água de 55,9% e viabilidade de 71,3%; (B) Sementes da cápsula 2, com teor de água de 23,8% e viabilidade de 92,5%. Barras = 0,5 mm. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.....24

**Figura 8.** Fluxograma do procedimento criopreservação por vitrificação (T3 e T4) de sementes imaturas do híbrido de *C. harrisoniana* x *C. walkeriana*, *C. tigrina*, *C. amethystoglossa* e *C. loddigesii* e sementes maduras de *C. guttata*. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.....26

**Figura 9.** Aspecto morfológico das cápsulas de *C. amethystoglossa* utilizadas no experimento. (A) Cápsula 1 - Sementes com teor de água de 50,5%; (B) Cápsula 2 - Sementes com teor de água de 41,8%; (C) Cápsula 3 - Sementes com teor de água de 40,9%. Barras = 1,0 cm. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.....31

**Figura 10.** Aspecto morfológico das sementes de *C. amethystoglossa* utilizadas no experimento, coradas pelo método do tetrazólio. (A) Sementes da cápsula 1, com teor de água de 50,5% e viabilidade de 80,0%; (B) Sementes da cápsula 2, com teor de água de 41,8% e viabilidade de 89,6%; (C) Sementes da cápsula 3, com teor de água de 40,9% e viabilidade de 69,3%. Barras = 0,5 mm. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.....32

**Figura 11.** Aspecto morfológico das cápsulas de *C. lueddemanniana* utilizadas no experimento. (A) Cápsula 1 - Sementes com teor de água de 80,5%; (B) Cápsula 2 - Sementes com teor de água de 16,4%. Barras = 1,0 cm. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.....32

**Figura 12.** Aspecto morfológico das sementes de *C. lueddemanniana* utilizadas no experimento, coradas pelo método do tetrazólio. (A) Sementes da cápsula 1, com teor de água de 80,5% e viabilidade de 47,2%; (B) Sementes da cápsula 2,

com teor de água de 16,4% e viabilidade de 79,3%. Barras = 0,5 mm. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.....33

**Figura 13.** Aspecto morfológico das cápsulas de *C. warneri* utilizadas no experimento. (A) Cápsula 1 - Sementes com teor de água de 38,9%; (B) Cápsula 2 - Sementes com teor de água de 21,4%. Barras = 1,0 cm. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.....33

**Figura 14.** Aspecto morfológico das sementes de *C. warneri* utilizadas no experimento, coradas pelo método do tetrazólio. (A) Sementes da cápsula 1, com teor de água de 38,9% e viabilidade de 59,8%; (B) Sementes da cápsula 2, com teor de água de 21,4% e viabilidade de 72,2%. Barras = 0,5 mm. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.....34

**Figura 15.** Fluxograma do procedimento criopreservação por desidratação de sementes imaturas de *C. amethystoglossa*, *C. lueddemanniana* e *C. warneri*. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.....35

**Figura 16.** Aspecto morfológico dos protocormos do híbrido de *C. harrisoniana* x *C. walkeriana*, *C. tigrina* e *C. guttata* aos 90 dias após a criopreservação das sementes. (A) Controle 1 - Germinação direta das sementes *in vitro*; (B) Controle 2 - Imersão em PVS2 durante uma hora em banho de gelo; (C) Imersão direta das sementes em NL; (D) Imersão em PVS2 durante 30 minutos em banho de gelo antes da imersão em NL; (E) Imersão em PVS2 durante uma hora em banho de gelo antes da imersão em NL. Barras = 1,0 cm. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.....40

**Figura 17.** Aspecto morfológico dos protocormos de *C. amethystoglossa* aos 90 dias após a criopreservação das sementes. (A) Controle 1 - Germinação direta das sementes *in vitro*; (B) Controle 2 - Imersão em PVS2 durante uma hora em banho de gelo; (C) Imersão direta das sementes em NL; (D) Imersão em PVS2 durante 30 minutos em banho de gelo antes da imersão em NL; (E) Imersão em PVS2 durante uma hora em banho de gelo antes da imersão em NL. Barra = 1 cm. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.....42

**Figura 18.** Aspecto morfológico dos protocormos de *C. loddigesii* aos 90 dias após a criopreservação das sementes. (A) Controle 1 - Germinação direta das sementes *in vitro*; (B) Controle 2 - Imersão em PVS2 durante uma hora em banho de gelo; (C) Imersão direta das sementes em NL; (D) Imersão em PVS2 durante 30 minutos em banho de gelo antes da imersão em NL; (E) Imersão em PVS2 durante uma hora em banho de gelo antes da imersão em NL. Barra = 1 cm. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.....43

**Figura 19.** Aspecto morfológico dos protocormos de *C. guttata* aos 90 dias após a criopreservação das sementes, do tratamento de imersão direta das sementes em NL. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.....45

**Figura 20.** Aspecto morfológico das plantas do híbrido de *C. harrisoniana* x *C. walkeriana*, *C. tigrina* e *C. guttata* provenientes de sementes criopreservadas após um ano de cultivo *in vitro*. (A) Germinação direta (Controle 1); (B) uma hora em PVS2 sem NL (Controle 2); (C) 30 minutos em PVS2 + NL; (D) uma hora em PVS2 + NL e (E) Imersão direta em NL sem PVS2. Barras = 4,0 cm. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.....46

**Figura 21.** Número de folhas (A, B e C), área foliar (D, E e F), volume radicular (G, H e I), massa da matéria fresca (J, K e L) e massa da matéria seca (M, N e O) de plantas do híbrido de *C. harrisoniana* x *C. walkeriana*, *C. tigrina* e *C. guttata* provenientes de sementes criopreservadas após um ano de cultivo *in vitro* e após seis meses de aclimatização em casa de vegetação. T1 - Germinação direta (Controle 1); T2 - uma hora em PVS2 sem NL (Controle 2); T3 - 30 minutos em PVS2 + NL; T4 - uma hora em PVS2 + NL; T5 - Imersão direta em NL sem PVS2. Letras comparam os tratamentos dentro de cada tempo para cada espécie e diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.....47

**Figura 22.** Aspecto morfológico das plantas de *C. amethystoglossa* provenientes de sementes criopreservadas após um ano de cultivo *in vitro*. (A) Germinação direta (Controle 1); (B) uma hora em PVS2 sem NL (Controle 2); (C) 30 minutos

em PVS2 + NL e (D) uma hora em PVS2 + NL. Barras = 4,0 cm. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.....49

**Figura 23.** Número de folhas (A, B e C), área foliar (D, E e F), volume radicular (G, H e I), massa da matéria fresca (J, K e L) e massa da matéria seca (M, N e O) de plantas de *C. amethystoglossa* provenientes de sementes criopreservadas após um ano de cultivo *in vitro* e após seis meses de aclimatização em casa de vegetação. T1 - Germinação direta (Controle 1); T2 - uma hora em PVS2 sem NL (Controle 2); T3 - 30 minutos em PVS2 + NL; T4 - uma hora em PVS2 + NL. Letras comparam os tratamentos dentro de cada tempo para cada espécie e diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.....50

**Figura 24.** Aspecto morfológico das plantas de *C. loddigesii* provenientes de sementes criopreservadas após 12 meses de cultivo *in vitro*. (A) Germinação direta (Controle 1); (B) uma hora em PVS2 sem NL (Controle 2); (C) 30 minutos em PVS2 + NL; (D) uma hora em PVS2 + NL e (E) Imersão direta das sementes em NL. Barras = 4,0 cm. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.....52

**Figura 25.** Número de folhas (A e B), área foliar (C e D), volume radicular (E e F), massa da matéria fresca (G e H) e massa da matéria seca (I e J) de plantas de *C. loddigesii* provenientes de sementes criopreservadas após um ano de cultivo *in vitro* e após seis meses de aclimatização em casa de vegetação. T1 - Germinação direta (Controle 1); T2 - uma hora em PVS2 sem NL (Controle 2); T3 - 30 minutos em PVS2 + NL; T4 - uma hora em PVS2 + NL; T5 - Imersão direta em NL sem PVS2. Letras comparam os tratamentos dentro de cada tempo para cada espécie e diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.....53

**Figura 26.** Índice de verde (A, B e C), relação  $F_v/F_m$  (D, E e F) e índice fotossintético (PI) (G, H e I) de plantas do híbrido de *C. harrisoniana* x *C. walkeriana*, *C. tigrina* e *C. guttata* provenientes de sementes criopreservadas após um ano de cultivo *in vitro* e após seis meses de aclimatização em casa de vegetação. T1 - Germinação direta (Controle 1); T2 - uma hora em PVS2 sem NL

(Controle 2); T3 - 30 minutos em PVS2 + NL; T4 - uma hora em PVS2 + NL; T5 - Imersão direta em NL sem PVS2. Letras comparam os tratamentos dentro de cada tempo para cada espécie e diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.....55

**Figura 27.** Índice de verde (A, B e C), relação  $F_v/F_m$  (D, E e F) e índice fotossintético (PI) (G, H e I) de plantas de *C. amethystoglossa* provenientes de sementes criopreservadas após um ano de cultivo *in vitro* e após seis meses de aclimatização em casa de vegetação. T1 - Germinação direta (Controle 1); T2 - uma hora em PVS2 sem NL (Controle 2); T3 - 30 minutos em PVS2 + NL; T4 - uma hora em PVS2 + NL. Letras comparam os tratamentos dentro de cada tempo para cada espécie e diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.....56

**Figura 28.** Índice de verde (A e B), relação  $F_v/F_m$  (C e D) e índice fotossintético (PI) (E e F) de plantas de *C. loddigesii* provenientes de sementes criopreservadas após um ano de cultivo *in vitro* e após seis meses de aclimatização em casa de vegetação. T1 - Germinação direta (Controle 1); T2 - uma hora em PVS2 sem NL (Controle 2); T3 - 30 minutos em PVS2 + NL; T4 - uma hora em PVS2 + NL; T5 - Imersão direta em NL sem PVS2. Letras comparam os tratamentos dentro de cada tempo para cada espécie e diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.....57

**Figura 29.** Aspecto morfológico das plantas do híbrido de *C. harrisoniana* x *C. walkeriana*, *C. tigrina* e *C. guttata* provenientes de sementes criopreservadas após seis meses de aclimatização em casa de vegetação. (A) Germinação direta (Controle 1); (B) uma hora em PVS2 sem NL (Controle 2); (C) 30 minutos em PVS2 + NL ; (D) uma hora em PVS2 + NL e (E) Imersão direta em NL sem PVS2. Barras = 4,0 cm. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.....59

**Figura 30.** Aspecto morfológico das plantas de *C. amethystoglossa* provenientes de sementes criopreservadas após seis meses de aclimatização em casa de vegetação. (A) Germinação direta (Controle 1); (B) uma hora em PVS2 sem NL

(Controle 2); (C) 30 minutos em PVS2 + NL e (D) uma hora em PVS2 + NL. Barras = 4,0 cm. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.....60

**Figura 31.** Aspecto morfológico das plantas de *C. loddigesii* provenientes de sementes criopreservadas após seis meses de aclimatização em casa de vegetação. (A) Germinação direta (Controle 1); (B) uma hora em PVS2 sem NL (Controle 2); (C) 30 minutos em PVS2 + NL; (D) uma hora em PVS2 + NL e (E) Imersão direta das sementes em NL. Barras = 4,0 cm. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.....60

**Figura 32.** Histogramas de citometria de fluxo obtidos de plantas oriundas de sementes criopreservadas do híbrido de *C. harrisoniana* x *C. walkeriana* (a) Germinação direta (Controle 1) (3,69 pg) e (b) uma hora em PVS2 + NL (3,65 pg); *C. tigrina* (c) Germinação direta (Controle 1) (3,70 pg) e (d) uma hora em PVS2 + NL (3,52 pg) e *C. guttata* (e) Germinação direta (Controle 1) (3,35 pg) e (f) Imersão direta em NL sem PVS2 (3,52 pg) germinadas *in vitro*. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.....65

**Figura 33.** Histogramas de citometria de fluxo obtidos de plantas oriundas de sementes criopreservadas de *C. amethystoglossa* - Cápsula 1 (a) Germinação direta (Controle 1) (3,72 pg) e (b) uma hora em PVS2 + NL (3,69 pg); *C. amethystoglossa* - Cápsula 2 (c) Germinação direta (Controle 1) (3,40 pg) e (d) uma hora em PVS2 + NL (3,53 pg) e *C. amethystoglossa* - Cápsula 3 (e) Germinação direta (Controle 1) (3,61 pg) e (f) uma hora em PVS2 + NL (3,44 pg) germinadas *in vitro*. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.....66

**Figura 34.** Histogramas de citometria de fluxo obtidos de plantas oriundas de sementes criopreservadas de *C. loddigesii* - Cápsula 1 (a) Germinação direta (Controle 1) (3,5 pg) e (b) uma hora em PVS2 + NL (3,34 pg) e *C. loddigesii* - Cápsula 2 (c) Germinação direta (Controle 1) (5,16 pg) e (d) uma hora em PVS2 + NL (4,96 pg) germinadas *in vitro*. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.....67

**Figura 35.** Estrutura anatômica foliar e radicular do híbrido de *C. harrisoniana* x *C. walkeriana*, *C. tigrina* e *C. guttata* após seis meses de aclimatização. (A), (B), (C),

(D), (E) e (F) – Secção transversal da porção mediana da folha (A), (B) e (C) – Secções de plantas provenientes de sementes não criopreservadas (controle) e (D), (E) e (F) – Secções de plantas provenientes de sementes criopreservadas; (G), (H), (I), (J), (K) e (L) – Secções transversais da porção mediana da raiz (G), (H) e (I) – Secções de plantas provenientes de sementes não criopreservadas (controle) e (J), (K) e (L) – Secções de plantas provenientes de sementes criopreservadas; (c = córtex; en = endoderme; epabx = epiderme abaxial; epadx = epiderme adaxial; ex = exoderme; fi = fibras; fv = feixe vascular; m = medula; ra = idioblastos com ráfides; v = velame). Barras = 200 µm. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.....70

**Figura 36.** Estrutura anatômica foliar e radicular de *C. amethystoglossa* - Cápsulas 1, 2 e 3 após seis meses de aclimatização. (A), (B), (C), (D), (E) e (F) – Secção transversal da porção mediana da folha (A), (B) e (C) – Secções de plantas provenientes de sementes não criopreservadas (controle) e (D), (E) e (F) – Secções de plantas provenientes de sementes criopreservadas; (G), (H), (I), (J), (K) e (L) – Secções transversais da porção mediana da raiz (G), (H) e (I) – Secções de plantas provenientes de sementes não criopreservadas (controle) e (J), (K) e (L) – Secções de plantas provenientes de sementes criopreservadas; (c = córtex; en = endoderme; epabx = epiderme abaxial; epadx = epiderme adaxial; ex = exoderme; fi = fibras; fv = feixe vascular; m = medula; ra = idioblastos com ráfides; v = velame). Barras = 200 µm. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.....71

**Figura 37.** Estrutura anatômica foliar e radicular de *C. loddigesii* - Cápsulas 1 e 2 após seis meses de aclimatização. (A), (B), (C) e (D) – Secção transversal da porção mediana da folha (A) e (B) – Secções de plantas provenientes de sementes não criopreservadas (controle) (C) e (D) – Secções de plantas provenientes de sementes criopreservadas; (E), (F), (G) e (H) – Secções transversais da porção mediana da raiz (E) e (F) – Secções de plantas provenientes de sementes não criopreservadas (controle) e (G) e (H) – Secções de plantas provenientes de sementes criopreservadas; (c = córtex; en = endoderme; epabx = epiderme abaxial; epadx = epiderme adaxial; ex = exoderme; fi = fibras; fv = feixe vascular; m = medula; ra = idioblastos com ráfides; v = velame). Barras = 200 µm. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.....72

**Figura 38.** Viabilidade de sementes (%) criopreservadas de *C. amethystoglossa* avaliada por 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio (TTC) em função do teor de água (%) nos tempos 0h, 24h, 48h, 72h, 96h e 30 dias em sílica gel (4°C) antes da imersão em NL. (A) Umidade inicial de 50,5% (Cápsula 1); (B) Umidade inicial de 41,8% (Cápsula 2); (C) Umidade inicial de 40,9% (Cápsula 3). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.....74

**Figura 39.** Viabilidade de sementes (%) criopreservadas de *C. lueddemanniana* avaliada por 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio (TTC) em função do teor de água (%) nos tempos 0h, 24h, 48h, 72h, 96h e 30 dias em sílica gel (4°C) antes da imersão em NL. (A) Umidade inicial de 80,5% (Cápsula 1); (B) Umidade inicial de 16,4% (Cápsula 2). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.....76

**Figura 40.** Viabilidade de sementes (%) criopreservadas de *C. warneri* avaliada por 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio (TTC) em função do teor de água (%) nos tempos 0h, 24h, 48h, 72h, 96h e 30 dias em sílica gel (4°C) antes da imersão em NL. (A) Umidade inicial de 38,9% (Cápsula 1); (B) Umidade inicial de 21,4% (Cápsula 2). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.....77

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Espécies de orquídeas brasileiras do gênero *Cattleya* ameaçadas de extinção, com a respectiva distribuição, bioma, hábito de crescimento, sistema vegetativo e risco de extinção de acordo com Ministério do Meio Ambiente (*Adaptado de Martinelli e Moraes, 2013*).....09
- Tabela 2.** Características biométricas e fisiológicas das cápsulas e das sementes do híbrido de *C. harrisoniana* x *C. walkeriana*, *C. tigrina* e *C. guttata* utilizadas no experimento. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.....22
- Tabela 3.** Características biométricas e fisiológicas das cápsulas e das sementes de *C. amethystoglossa* utilizadas no experimento. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.....23
- Tabela 4.** Características biométricas e fisiológicas das cápsulas e das sementes de *C. loddigesii* utilizadas no experimento. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.....24
- Tabela 5.** Tratamentos utilizados no experimento de criopreservação de sementes imaturas do híbrido de *C. harrisoniana* x *C. walkeriana*, *C. tigrina*, *C. amethystoglossa* e *C. loddigesii* e sementes maduras de *C. guttata*. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.....25

<b>Tabela 6.</b> Características biométricas e fisiológicas das cápsulas e das sementes de <i>C. amethystoglossa</i> utilizadas no experimento. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.....	32
<b>Tabela 7.</b> Características biométricas e fisiológicas das cápsulas e das sementes de <i>C. lueddemanniana</i> utilizadas no experimento. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.....	33
<b>Tabela 8.</b> Características biométricas e fisiológicas das cápsulas e das sementes de <i>C. warneri</i> utilizadas no experimento. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020....	34
<b>Tabela 9.</b> Viabilidade pelo método do tetrazólio após a criopreservação e germinação das sementes criopreservadas do híbrido de <i>C. harrisoniana</i> x <i>C. walkeriana</i> , <i>C. tigrina</i> e <i>C. guttata</i> , 90 dias após o semeio <i>in vitro</i> . Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.....	38
<b>Tabela 10.</b> Germinação das sementes de <i>C. amethystoglossa</i> criopreservadas, 90 dias após a semeadura. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.....	41
<b>Tabela 11.</b> Germinação das sementes de <i>C. loddigesii</i> criopreservadas, 90 dias após a semeadura. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.....	43
<b>Tabela 12.</b> Médias de conteúdo de DNA, determinado por citometria de fluxo, de plantas do híbrido de <i>C. harrisoniana</i> x <i>C. walkeriana</i> , <i>C. tigrina</i> e <i>C. guttata</i> provenientes de sementes criopreservadas, após um ano de cultivo <i>in vitro</i> . Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.....	65
<b>Tabela 13.</b> Médias de conteúdo de DNA, determinado por análise de citometria de fluxo de plantas de <i>C. amethystoglossa</i> provenientes de sementes criopreservadas, após um ano de cultivo <i>in vitro</i> . Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.....	66

**Tabela 14.** Médias de conteúdo de DNA, determinado por análise de citometria de fluxo de plantas de *C. loddigesii* provenientes de sementes criopreservadas, após um ano de cultivo *in vitro*. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.....67

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**C.V. (%)** - coeficiente de variação.

**CCTA** - Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias.

**DBC** - Delineamento em blocos casualizados.

**DIC** - Delineamento inteiramente casualizado.

**DMSO** - Dimetil sulfóxido.

**LFIT** - Laboratório de Fitotecnia.

**MS** - Sais minerais do MS (Murashige e Skoog, 1962).

**NaClO** - Hipoclorito de sódio.

**NL** - Nitrogênio líquido.

**pH** - Potencial hidrogeniônico.

**PI** - Índice fotossintético.

**PVS2** - Plant Vitrification Solution 2 (Sakai et al., 1990).

**Rubisco** - Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase oxigenase.

**SL** - Solução de lavagem.

**SO** - Solução de osmoproteção.

**UAP** - Unidade de Apoio à Pesquisa.

**UENF** - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

**WPB** - Woody Plant Buffer.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	xx
<b>ABSTRACT</b> .....	xxii
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	4
2.1. Geral.....	4
2.2. Específicos.....	4
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	6
3.1. Aspectos botânicos e econômicos da família Orchidaceae.....	6
3.2. A biodiversidade das orquídeas.....	8
3.3. Estratégias de conservação da biodiversidade das orquídeas.....	10
3.4. A germinação <i>in vitro</i> na conservação da biodiversidade das orquídeas...	11
3.5. O método de criopreservação.....	13
3.5.1. Técnica de criopreservação por vitrificação.....	14
3.5.2. Técnica de criopreservação por desidratação.....	15
3.6. Criopreservação de sementes de orquídeas.....	16
3.7. Estabilidade genética do material preservado.....	18
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	20
4.1. Experimentos de criopreservação pela técnica de vitrificação.....	20
4.1.1. Material vegetal.....	20
4.1.2. Obtenção e caracterização das sementes.....	21
4.1.3. Criopreservação das sementes.....	25

4.1.4. Teste de viabilidade das sementes criopreservadas.....	26
4.1.5. Germinação <i>in vitro</i> das sementes.....	27
4.1.6. Crescimento <i>in vitro</i> das plântulas.....	27
4.1.6.1. Análises biométricas.....	27
4.1.6.2. Análises fisiológicas.....	28
4.1.7. Aclimatização das plantas.....	28
4.1.8. Avaliação da estabilidade genética das plantas em citômetro de fluxo...	29
4.1.9. Análise anatômica das plantas em microscópio óptico.....	30
4.2. Experimento de criopreservação pela técnica de desidratação.....	30
4.2.1. Material vegetal.....	30
4.2.2. Obtenção e caracterização das sementes.....	30
4.2.3. Desidratação e criopreservação das sementes.....	34
4.2.4. Teste de viabilidade das sementes criopreservadas.....	35
4.3. Análise estatística dos dados.....	35
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>37</b>
5.1. Experimentos de criopreservação pela técnica de vitrificação.....	37
5.1.1. Viabilidade e germinação <i>in vitro</i> das sementes.....	37
5.1.2. Crescimento <i>in vitro</i> das plântulas.....	45
5.1.2.1. Análises biométricas.....	45
5.1.2.2. Análises fisiológicas.....	54
5.1.3. Aclimatização das plantas.....	58
5.1.3.1. Análises biométricas.....	58
5.1.3.2. Análises fisiológicas.....	63
5.1.4. Avaliação da estabilidade genética das plantas em citômetro de fluxo...	64
5.1.5. Análise anatômica das plantas em microscópio óptico.....	68
5.2. Experimento de criopreservação pela técnica de desidratação.....	73
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>79</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>80</b>

## RESUMO

VETTORAZZI, Renato Gobbi; D.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Fevereiro, 2020; Criopreservação de orquídeas brasileiras do gênero *Cattleya*; Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Virginia Silva Carvalho. Conselheiras: Prof<sup>a</sup>. Rosana Rodrigues e Prof<sup>a</sup>. Telma Nair Santana Pereira.

A principal limitação na criopreservação de orquídeas está na resposta específica das espécies aos protocolos de criopreservação, dificultando a generalização e o desenvolvimento de um protocolo de criopreservação de caráter universal. O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência da criopreservação pelas técnicas de vitrificação e desidratação como forma de conservação a longo prazo de sementes imaturas e maduras de orquídeas brasileiras do gênero *Cattleya*. Para cada espécie ou híbrido, o experimento de criopreservação por vitrificação foi conduzido em DIC com cinco tratamentos: germinação direta *in vitro*, sem PVS2 e sem NL, PVS2 a 0°C durante 60 minutos e sem NL, PVS2 a 0°C durante 30 minutos e uma hora antes da imersão em NL, e imersão direta das sementes em NL, sem PVS2. Após a criopreservação, foram avaliados a viabilidade das sementes, a germinação das sementes e o crescimento das plântulas *in vitro* e das plantas após a aclimatização em casa de vegetação. A estabilidade genética das plantas foi verificada por citometria de fluxo após o cultivo *in vitro*. Análises anatômicas foram feitas nas plantas após a aclimatização. Para cada espécie, o experimento de criopreservação por desidratação foi conduzido em DIC com seis tratamentos - 0h, 24h, 48h, 72h, 96h e 30 dias - sobre sílica gel antes da imersão

em NL. Após a criopreservação, as sementes de todos os tratamentos foram submetidas ao teste de viabilidade. Para cada intervalo de tempo sobre sílica gel, o teor de água das sementes também foi calculado. A exposição das sementes imaturas do híbrido de *C. harrisoniana* x *C. walkeriana* e das espécies de *C. tigrina*, *C. amethystoglossa* e *C. loddigesii* por uma hora em PVS2, antes da imersão em NL, foi benéfica ao processo de criopreservação. Enquanto para *C. guttata*, a imersão direta das sementes maduras com baixo teor de água em NL foi eficaz, não sendo necessária a utilização da vitrificação. As plantas obtidas após a criopreservação das sementes apresentaram fenótipos, morfologia e anatomia normais e sem alterações no nível de ploidia em relação às plantas do controle. Para *C. amethystoglossa*, sementes com umidade inicial entre 40 e 50% devem ser desidratadas por 96h em sílica gel em geladeira antes da imersão em NL. Para *C. lueddemanniana*, sementes com 16,4% de umidade podem ser imersas diretamente no NL, já sementes com 80,5% de umidade devem ser desidratadas por 24h em sílica gel em geladeira antes da imersão em NL. Para a espécie *C. warneri*, sementes com 21,4% de umidade podem ser imersas diretamente no NL, já as sementes com 38,9% de umidade devem ser desidratadas em sílica gel por, no mínimo, 24h em geladeira antes da imersão em NL. Estes resultados demonstram o efeito do teor de água das sementes na criopreservação. Para a criopreservação de sementes com elevado teor de água, a vitrificação em PVS2 ou a desidratação em sílica gel são necessárias. De forma geral, a criopreservação pelas técnicas de vitrificação e desidratação foi eficiente para a conservação das sementes imaturas de orquídeas do gênero *Cattleya* utilizadas neste trabalho.

**Palavras-chave:** Orchidaceae; Banco Criogênico; Vitrificação; Desidratação; Manutenção da Diversidade; Conservação de Germoplasma.

## ABSTRACT

VETTORAZZI, Renato Gobbi; D.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; February, 2020; Cryopreservation of Brazilian orchids of the genus *Cattleya*; Advisor: Virginia Silva Carvalho. Committee members: Rosana Rodrigues and Telma Nair Santana Pereira.

The major limitation on orchid cryopreservation is the species-specific response to cryopreservation protocols, making it difficult to generalize and develop a universal cryopreservation protocol. The objective of this work was to evaluate the efficiency of cryopreservation by vitrification and dehydration techniques as a long term conservation of immature and mature seeds of Brazilian orchids of the genus *Cattleya*. For each species or hybrid, the vitrification-based cryopreservation experiment was conducted in DIC with five treatments: direct seed germination *in vitro*, without PVS2 and without LN, PVS2 at 0°C for 60 min and without LN, PVS2 at 0°C for 30 min and 1 h before LN immersion, and direct seed immersion in LN, without PVS2. After cryopreservation, seed viability, seed germination and seedling growth *in vitro* and plants after greenhouse acclimatization were evaluated. Plant genetic stability was verified by flow cytometry after *in vitro* cultivation. Anatomical analyzes were done on plants after acclimatization. For each species, the dehydration cryopreservation experiment was conducted in DIC with six treatments: 0h, 24h, 48h, 72h, 96h and 30 days on silica gel before LN immersion. After cryopreservation, the seeds of all treatments were submitted to the viability test. For each time interval on silica gel the water content of the seeds

was also calculated. The exposure of immature seeds of *C. harrisoniana* x *C. walkeriana* hybrid and *C. tigrina*, *C. amethystoglossa* and *C. loddigesii* species for one hour in PVS2 before LN immersion was beneficial to the cryopreservation process. While for *C. guttata* the direct immersion of mature seeds with low water content in LN was effective, not requiring the use of vitrification. Plants obtained after seed cryopreservation presented normal phenotypes, morphology and anatomy and no changes in ploidy level in relation to control plants. For *C. amethystoglossa*, seeds with initial moisture between 40 and 50% should be dehydrated for 96h in silica gel in a refrigerator before immersion in LN. For *C. lueddemanniana*, seeds with 16.4% humidity can be immersed directly in LN, while seeds with 80.5% humidity should be dehydrated for 24 h in silica gel in a refrigerator before immersion in LN. For *C. warneri* species, seeds with 21.4% humidity can be immersed directly in LN, while seeds with 38.9% humidity should be dehydrated in silica gel for at least 24h in a refrigerator before immersion in LN. These results demonstrate the effect of seed water content on cryopreservation. For cryopreservation of seeds with high water content PVS2 vitrification or silica gel dehydration is required. In general, cryopreservation by vitrification and dehydration techniques was efficient for the conservation of immature seeds of orchids of the genus *Cattleya* used in this work.

**Keywords:** Orchidaceae; Cryogenic Bank; Vitrification; Dehydration; Maintenance of diversity; Germplasm Conservation.

## 1. INTRODUÇÃO

As orquídeas pertencem à família Orchidaceae, considerada a família de plantas de maior valor comercial e ornamental entre as plantas ornamentais (Teixeira da Silva et al., 2014). No Brasil, são conhecidos, aproximadamente, 221 gêneros de orquídeas e 2.497 espécies, sendo endêmicas cerca de 64% das espécies, podendo ser considerado um dos países mais ricos em diversidade de orquídeas (Barros et al., 2016). Porém, segundo dados da Portaria nº 443, de 17 de dezembro de 2014, do Ministério do Meio Ambiente, que reconhece as espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção, um significativo número de orquídeas brasileiras corre sério risco de extinção. Entre as 168 espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção, 15 pertencem ao gênero *Cattleya*, entre elas *C. guttata*, *C. harrisoniana*, *C. tigrina*, *C. walkeriana* e *C. warneri*, utilizadas neste trabalho.

Devido ao grande número de espécies de orquídeas ameaçadas de extinção, métodos de conservação são necessários para garantir a preservação e uso futuro de espécies de orquídeas sem perder sua variabilidade genética. O banco de sementes é um dos pilares da conservação *ex situ* da biodiversidade.

As orquídeas podem ser armazenadas em bancos de sementes (Seaton et al., 2010), em temperatura ambiente, geladeira (4°C) ou freezer (-20°C), porém a viabilidade é reduzida em poucas semanas ou meses, dependendo da espécie,

do teor de água inicial e da temperatura de armazenamento. A redução do teor de água das sementes e/ou da temperatura de armazenamento pode manter a viabilidade das sementes de orquídeas por um maior período de tempo (Pritchard e Seaton, 1993; Li e Pritchard, 2009; Hay et al., 2010).

A conservação de sementes de orquídeas em bancos criogênicos pode auxiliar na reintrodução de espécies em seu *habitat*, bem como no cultivo em grande escala para fins comerciais, além de ser uma ferramenta valiosa em programas de melhoramento de plantas (Vendrame et al., 2007; Galdiano et al., 2017). O uso de sementes na criopreservação de orquídeas é ideal no caso de espécies ameaçadas de extinção, uma vez que as sementes são obtidas sem a destruição da planta-mãe (Kulus e Zalewska, 2014). Milhares de sementes podem ser armazenadas em um espaço relativamente pequeno com baixa necessidade de manutenção (Popova et al., 2003). Se comparada com outros materiais, a criopreservação de sementes oferece a vantagem adicional de armazenar uma diversidade genética mais ampla (Vendrame et al., 2014).

As sementes imaturas são as mais utilizadas na propagação *in vitro* de orquídeas, devido à redução do risco de contaminação, por estarem isoladas nas cápsulas fechadas. No entanto, sementes imaturas têm maior teor de água e na criopreservação a exposição direta dessas sementes em nitrogênio líquido (NL) pode ser letal pela formação de gelo intracelular (Hirano et al., 2005a). A maioria das sementes maduras de orquídeas pode ser criopreservada com sucesso pela imersão direta em NL, desde que apresentem menos de 13% de teor de água, o que reduz o risco de danos intracelulares pela menor formação de cristais de gelo. Entretanto, algumas sementes maduras de orquídeas podem não suportar a exposição direta à temperatura do NL, mesmo com baixo teor de água (Popova et al., 2016).

A criopreservação de materiais com alto teor de água pode ser viável pelo método de vitrificação. O principal objetivo da vitrificação é obter a solidificação das estruturas celulares de forma que permaneçam viscosas e estáveis, evitando, assim, a formação de cristais de gelo no interior das células e os danos que podem causar às membranas (Engelmann, 2004). Este procedimento envolve a desidratação das amostras com soluções crioprotetoras altamente concentradas. A *Plant Vitrification Solution 2* (PVS2) é a solução vitrificante mais utilizada, originalmente proposta por Sakai et al. (1990), composta por 30% de glicerol, 15%

de etilenoglicol, 15% de DMSO e  $0,15 \text{ mol L}^{-1}$  de sacarose, sendo a concentração de sacarose aumentada posteriormente para  $0,4 \text{ mol L}^{-1}$  por Nishizawa et al. (1993).

Já para a criopreservação de materiais que toleram baixo teor de água, uma boa sobrevivência pode ser obtida pelo método de desidratação. A desidratação é um processo de criopreservação mais simples, que consiste em desidratar explantes em cabine de fluxo laminar de ar, sílica gel ou soluções salinas saturadas. Em seguida, os explantes com umidade de até 20% são congelados rapidamente por imersão direta em NL (Engelmann, 1997).

As diferentes respostas obtidas de acordo com o teor de água das sementes reforçam a necessidade da investigação do comportamento dos diversos gêneros de orquídeas durante a criopreservação (Merritt et al., 2014). Além disso, apesar da importância da conservação das orquídeas do gênero *Cattleya*, com algumas correndo sério risco de extinção, há apenas um trabalho na literatura sobre criopreservação de sementes deste gênero, com *C. walkeriana* (Galdiano et al., 2017). A maioria dos trabalhos de criopreservação envolve o emprego de sementes maduras de orquídeas terrestres e algumas epífitas, como *Dendrobium* e *Vanda* (Popova et al., 2016).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Geral

Desenvolver estudos para a criopreservação de diferentes espécies de orquídeas brasileiras do gênero *Cattleya*, visando a estabelecer futuramente a implantação de um banco de germoplasma criogênico de orquídeas na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

### 2.2. Específicos

- Avaliar a eficiência da criopreservação pela técnica de vitrificação como forma de conservação a longo prazo de sementes imaturas do híbrido de *C. harrisoniana* x *C. walkeriana*, *C. amethystoglossa*, *C. loddigesii*, *C. tigrina* e sementes maduras de *C. guttata*.
- Verificar o desenvolvimento inicial *in vitro* das plantas desenvolvidas, provenientes das sementes criopreservadas.
- Verificar a estabilidade genética das plantas desenvolvidas *in vitro*, provenientes das sementes criopreservadas, por meio da citometria de fluxo.
- Verificar a anatomia das plantas desenvolvidas *in vitro*, provenientes das sementes criopreservadas, por meio da microscopia óptica.
- Verificar a viabilidade das mudas de orquídeas aclimatizadas provenientes das sementes criopreservadas.

- Avaliar a eficiência da criopreservação pela técnica de desidratação como forma de conservação a longo prazo de sementes imaturas de *C. amethystoglossa*, *C. lueddemanniana* e *C. warneri*.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Aspectos botânicos e econômicos da família Orchidaceae

Com mais de 880 gêneros descritos, 25.000 espécies e mais de 150.000 híbridos registrados, as orquídeas compõem a maior família de plantas com flores (cerca de 10%). Originadas durante o período Cretáceo, quando a maioria das angiospermas se diferenciou, as orquídeas têm distribuição cosmopolita, ocorrendo em quase todos os ecossistemas da terra, com exceção do polo sul. São plantas herbáceas, perenes, com folhas geralmente com nervura paralelinérvea (Givnish et al., 2015).

Quanto ao seu *habitat*, as orquídeas podem ser rupículas (5%), terrestres (25%) ou epífitas (70%), não existindo espécies parasitas. Enquanto a maioria das orquídeas de clima temperado é terrestre, as orquídeas tropicais são epífitas ou rupículas. O crescimento pode ser do tipo prostado (simpodial), ereto (monopodial) ou misto. Suas flores são formadas por três sépalas e três pétalas, sendo uma modificada, que recebe o nome de labelo. As pétalas e sépalas têm, em geral, a mesma cor, e o labelo é a parte mais atraente e a mais colorida da flor (Givnish et al., 2015).

As orquídeas são alógamas em sua maioria, com adaptações para evitar a autopolinização. Os insetos são os agentes polinizadores mais comuns. A ordem Hymenoptera, da qual fazem parte abelhas e vespas, é o principal grupo de polinizadores. Um número menor de espécies é polinizado por moscas,

mosquitos, besouros, borboletas, mariposas e por aves como os beija-flores (Dressler, 1993).

As orquídeas são conhecidas e cultivadas principalmente como plantas ornamentais, pelas suas belas flores de longa duração, que exibem grande diversidade de cores, formas, tamanhos e fragrâncias. As orquídeas representam 8% do comércio da floricultura global, e centenas de novas variedades são registradas todos os anos (Martin e Madassery, 2006). Nos Estados Unidos, em 2011, as orquídeas se tornaram a segunda planta de flores de vaso mais popular (US Department of Agriculture 2012).

Além do uso ornamental, os produtos das orquídeas são amplamente utilizados nas indústrias alimentícias e de bebidas. Mais especificamente, a baunilha, essência aromatizante e condimentar, extraída de frutos de espécies do gênero *Vanilla* (entre eles a *Vanilla planifolia*) e o salep ("Sahlep" em árabe), feito de tubérculos secos de *Orchis morio* (atualmente *Anacamptis morio*), utilizado na fabricação de sorvetes e bebidas (Bulpitt, 2005).

Em relação à utilização das orquídeas na medicina, todas as suas partes têm sido utilizadas, incluindo folhas, raízes, flores, pseudobulbos, tubérculos, rizomas ou toda a planta (Singh e Duggal, 2009; Gutiérrez, 2010; Jalal et al., 2010; Pant, 2013). Na tradicional medicina chinesa, as principais espécies de orquídeas nativas dos gêneros *Dendrobium* e *Cymbidium* servem como ingredientes de produtos terapêuticos para o tratamento de várias doenças, incluindo diabetes, câncer de pulmão, doenças do estômago, alergias e fadiga (Paek e Murthy, 2002; Ng et al., 2012; Liu et al., 2014). Plantas dos gêneros *Cypripedium*, *Vanilla*, *Arpophyllum*, *Bletilla* e *Epidendrum* são utilizadas para uso medicinal por diferentes grupos étnicos na América do Norte e México, enquanto os europeus reconhecem o valor medicinal das orquídeas terrestres *Orchis* spp., *Dactylorhiza* spp. e *Epipactis* spp. (Bulpitt, 2005; Pant, 2013). Outras propriedades medicinais são relatadas, como tônico, antibacteriano, afrodisíaco, antitumorais, propriedades antitérmicas e cicatrizantes (Bulpitt et al., 2007; Singh e Duggal, 2009; Gutiérrez, 2010), contribuindo para a cura e ajudando na reversão de sintomas da tuberculose, indigestão, dor de cabeça, febre, ossos fraturados, doenças do estômago e picadas de cobra (Bulpitt, 2005; Pant, 2013). O valor medicinal de algumas espécies de orquídeas tradicionalmente utilizadas tem sido comprovado mais recentemente por ensaios clínicos (Shih et al., 2002; Kim et al.,

2003; Morita et al., 2005; Li et al., 2011). A presença de produtos químicos ativos medicinalmente como polissacarídeos e metabólitos secundários, incluindo alcaloides, glicosídeos, compostos fenólicos entre outros também têm sido estudados em tecidos vegetais de orquídeas (Gutiérrez, 2010; Ng *et al.*, 2012).

### 3.2. A biodiversidade das orquídeas

As orquídeas constituem importante parte da biodiversidade vegetal do planeta, pela sua alta variabilidade entre as espécies e entre seus *habitats*. Em média, a cada ano são descobertas mais de cem novas espécies (Carnevali et al., 2014; Vale et al., 2014; Kolanowska, 2015) e no ano de 2013, cerca de 370 delas foram descritas (Schuiteman, 2015). Porém o conhecimento a respeito da diversidade genética das orquídeas é bem restrito, diante da perspectiva de que muitas espécies tenham sido ou possam ser extintas antes mesmo de sua descoberta.

Em comparação com as outras plantas, as orquídeas são consideradas as plantas vasculares mais evoluídas. Nos milhões de anos de existência, elas se modificaram e se adaptaram a quase todos os ambientes (Dasgupta et al., 2004). As orquídeas são extremamente vulneráveis a estresses bióticos e abióticos em razão da alta especificidade por insetos polinizadores, das sementes minúsculas (150-6.000  $\mu\text{m}$ ) sem endosperma e do ciclo de vida que exige uma associação simbiótica com fungos micorrízicos (que fornecem carboidratos, sais minerais, vitaminas e água) para a germinação em condições naturais (Arditti e Ernst, 1984; Vinogradova e Andronova, 2002; Kandavel et al., 2004).

São consideradas as "pandas do mundo vegetal" (Wood, 1989) em razão das muitas espécies ameaçadas de extinção e da previsão de que o aquecimento global produza mudanças irreversíveis às espécies de orquídeas (Seaton et al., 2010), com efeitos susceptíveis de serem mais graves em regiões montanhosas e tropicais, incluindo muitos *hotspots* de biodiversidade de orquídeas na Ásia e América Latina (Seaton e Pritchard, 2011).

No Brasil, são conhecidas aproximadamente 2.497 espécies e 221 gêneros de orquídeas, que constituem um rico patrimônio orquidológico de incalculável valor e beleza. A região Sudeste apresenta 60% das espécies conhecidas. A Mata Atlântica é considerada o principal *habitat* brasileiro destas

plantas, apresentando cerca de 60% das espécies, com espécies endêmicas de relevante valor ornamental e comercial, seguida pela Amazônia e pelo Cerrado (Barros et al., 2016). As orquídeas contribuíram para tornar o Brasil conhecido internacionalmente por suas plantas exóticas, apesar de terem sido obtidas, quase sempre, pelo extrativismo predatório das matas tropicais, não de cultivos comerciais (Kämpf, 1997). Somado à coleta predatória para coleções privadas, tem-se ainda a destruição crescente dos *habitats* de inúmeras espécies de orquídeas em razão dos avanços das fronteiras agrícolas para pecuária ou cultivos agrícolas, construção de estradas e hidrelétricas, entre outros, resultando na extinção de muitas espécies e variedades de orquídeas ou na sua via de extinção na natureza (Forni-Martins et al., 2013; CNC Flora, 2016).

Segundo dados da Portaria nº 443, de 17 de dezembro de 2014, do Ministério do Meio Ambiente, que reconhece as espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção, entre as 168 espécies de orquídeas da flora brasileira ameaçadas de extinção, 15 pertencem ao gênero *Cattleya* (Tabela 1).

**Tabela 1.** Espécies de orquídeas brasileiras do gênero *Cattleya* ameaçadas de extinção, com a respectiva distribuição, bioma, hábito de crescimento, sistema vegetativo e risco de extinção, segundo o Ministério do Meio Ambiente (*Adaptado de Martinelli e Moraes, 2013*).

<b>Espécie</b>	<b>Distribuição</b>	<b>Bioma</b>	<b>Hábito de Crescimento</b>	<b>Sistema Vegetativo</b>	<b>Risco</b>
<i>Cattleya aelandiae</i> Lindl. 1840	BA e ES	Caatinga e Mata Atlântica	Epífitas de grandes e rugosas árvores	Bifoliada	“Vulnerável” (VU)
<i>Cattleya dormiana</i> Rchb.f. 1880	RJ	Mata Atlântica	Epífita	Bifoliada	“Em Perigo” (EN)
<i>Cattleya granulosa</i> Lindl. 1842	AL, BA, CE, PB, PI e RN	Caatinga e Mata Atlântica	Epífita em brejos	Bifoliada	“Vulnerável” (VU)
<i>Cattleya guttata</i> Lindl. 1832	AL, BA, ES, MG, PR, PB, RJ, RS, SC e SP	Cerrado e Mata Atlântica	Epífita, terrestre em areia ou rupícula	Bifoliada	“Vulnerável” (VU)

**Tabela 1 – Cont.**

<b>Espécie</b>	<b>Distribuição</b>	<b>Bioma</b>	<b>Hábito de Crescimento</b>	<b>Sistema Vegetativo</b>	<b>Risco</b>
<i>Cattleya harrisoniana</i> Batem. ex Lindl. 1836	BA, ES, MG, RJ e SP	Mata Atlântica	Epífita	Bifoliada	“Vulnerável” (VU)
<i>Cattleya intermedia</i> Grah. 1828	PE, PR, RJ, RS, SC e SP	Cerrado, Mata Atlântica e Pampa	Epífita ou rupícula	Bifoliada	“Vulnerável” (VU)
<i>Cattleya labiata</i> Lindl. 1821	AL, BA, CE, ES, PB, PE, SE e SP	Caatinga e Mata Atlântica	Epífita	Monofoliada	“Vulnerável” (VU)
<i>Cattleya porphyroglossa</i> Linden e Rchb.f. 1856	BA, ES, MG, PR, RJ e SC	Mata Atlântica	Epífita	Bifoliada	“Criticamente em Perigo” (CR)
<i>Cattleya schilleriana</i> Rchb.f. 1857	BA, ES e RJ	Mata Atlântica	Epífita e algumas vezes rupícula	Bifoliada	“Em Perigo” (EN)
<i>Cattleya schofieldiana</i> Rchb.f. 1882	ES	Mata Atlântica	Epífita	Bifoliada	“Criticamente em Perigo” (CR)
<i>Cattleya tenuis</i> Campacci e Vedovello 1983	BA	Caatinga e Mata Atlântica	Epífita, terrestre ou rupícula	Bifoliada	“Em Perigo” (EN)
<i>Cattleya tigrina</i> A.Rich. 1848	BA, RS, SC e SP	Mata Atlântica e Pampa	Epífita ou rupícola	Bifoliada	“Vulnerável” (VU)
<i>Cattleya velutina</i> Rchb.f. 1870	BA, ES, MG, RJ e SP	Caatinga e Mata Atlântica	Epífita	Bifoliada	“Vulnerável” (VU)
<i>Cattleya walkeriana</i> Gardner 1843	DF, GO, MG, MS, MT e SP	Cerrado e Mata Atlântica	Epífita ou rupícula	Bifoliada	“Vulnerável” (VU)
<i>Cattleya warneri</i> T.Moore 1860	BA, ES, MG e RJ	Mata Atlântica	Epífita e raramente rupícula	Monofoliada	“Vulnerável” (VU)

### 3.3. Estratégias de conservação da biodiversidade das orquídeas

A conservação do germoplasma de orquídeas é importante para sua utilização futura em programas de melhoramento genético ou em programas de conservação, que buscam a reintrodução de espécies nativas com a finalidade de restauração ambiental (Ishikawa, 1997).

Em razão do grande número de espécies ameaçadas de extinção, métodos de conservação são necessários para garantir sua preservação e uso futuro sem perder sua variabilidade genética. Amostras de plantas podem ser conservadas *in situ*, isto é, no seu *habitat*, requerendo um alto custo de manutenção, necessidade de grandes áreas de terra, além de continuarem vulneráveis a fatores abióticos e bióticos como intempéries, pragas e doenças (Kandavel et al., 2004).

Tradicionalmente, os Jardins Botânicos desempenham relevante papel na conservação de orquídeas pelo desenvolvimento e manutenção bem documentada de coleções vivas (por exemplo, cerca de 2.700 espécies no Royal Botanic Gardens, Kew, Reino Unido), do armazenamento das sementes, estabelecendo e desenvolvendo de técnicas de propagação *in vitro*, da criação de criobancos e de bancos de DNA para pesquisas filogenéticas (Kolomeitseva et al., 2011; Swarts e Dixon, 2009).

O banco de sementes tem sido utilizado como uma opção viável e eficaz para a conservação *ex situ* de algumas plantas, incluindo as orquídeas (Pritchard et al., 1999). No entanto, algumas sementes de orquídeas têm curta viabilidade (Pritchard e Dickie, 2003; Hay et al., 2010). Sob condições de temperatura ambiente ou em temperaturas elevadas (20-40°C), elas podem perder a viabilidade em semanas ou dias (Pritchard et al., 1999). Já o armazenamento em baixas temperaturas (-20 a 4°C) tende a prolongar a vida útil das sementes (Pritchard e Dickie, 2003). Alguns estudos indicam que sementes secas de algumas orquídeas têm potencial para sobreviver durante décadas em refrigeração convencional (cerca de 5°C) ou congelador (-20°C) (Pritchard e Seaton, 1993; Hosomi et al., 2012).

Entretanto, para algumas espécies de orquídeas, o armazenamento em baixas temperaturas parece não ser eficiente (Merritt et al., 2014). Além disso, a germinação das sementes de orquídeas varia de acordo com a idade, seu tempo de armazenamento e mudanças nas condições de germinação, como a composição nutricional do meio de cultivo (Nikishina et al., 2007; Hay et al., 2010).

### **3.4. A germinação *in vitro* na conservação da biodiversidade das orquídeas**

A biotecnologia desempenha importante papel nos programas internacionais de conservação biológica de plantas. Uma das aplicações mais importantes da biotecnologia na conservação e no uso sustentável da diversidade de orquídeas é a germinação *in vitro* (Kaviani, 2011).

As sementes de orquídeas requerem a associação com fungos simbiotes para sua sobrevivência *in situ* e tais condições podem ser replicadas *ex situ*. Segundo Yam e Arditti (2009), Knudson (1922) desenvolveu um método eficiente para a germinação assimbiótica de sementes de orquídeas usando meios com nutrientes complexos, com base nos trabalhos de Moore (1849) e Bernard (1899). Yam e Arditti (2009) ainda citam que Rotor (1949), Thomale (1956) e Morel (1960) foram pioneiros no cultivo *in vitro* de explantes de orquídeas. Desde então, técnicas *in vitro* para germinação, propagação e multiplicação em larga escala de orquídeas têm sido amplamente utilizadas tanto para fins de conservação como de comércio (Dasgupta et al., 2004; Teixeira da Silva, 2013b).

Para algumas espécies de orquídeas, a maturação das sementes no fruto requer um longo tempo (Nikishina et al., 2007) e todo o processo do desenvolvimento embrionário até a formação das plântulas pode levar meses ou anos, especialmente para espécies de clima temperado (Nikishina et al., 2001). Para tais espécies, a germinação das sementes imaturas *in vitro* é considerada interessante por reduzir o tempo de espera da sua maturação (Hirano et al., 2005a; 2005b; Nikishina et al., 2007).

Entretanto, o sucesso da propagação *in vitro* não elimina a necessidade de conservação *ex situ* de orquídeas. De fato, todos os tipos de materiais cultivados *in vitro* utilizados para a rápida propagação de orquídeas também podem ser utilizados para fins de conservação. Recentemente, técnicas de crescimento lento (ou cultivo mínimo) *in vitro* e armazenamento em baixas temperaturas (0-16°C) provaram ser eficazes para algumas espécies do gênero *Dendrobium* (Teixeira da Silva et al., 2014). No entanto, a conservação *in vitro* de orquídeas em meio nutritivo por cultivo mínimo é relativamente cara e trabalhosa, requerendo tempo do manipulador. É possível observar ainda variações somaclonais em materiais de orquídeas cultivados *in vitro*, além da perda de materiais por contaminação (Arditti, 2008; Khoddamzadeh et al., 2010; Teixeira da Silva et al., 2014).

Tais limitações têm promovido o desenvolvimento de métodos de conservação mais baratos e mais confiáveis como a criopreservação, que permite uma segura armazenagem do germoplasma de orquídeas a longo prazo, desde que protocolos adequados sejam desenvolvidos e validados (Engelmann, 2004; Pritchard, 2007).

### 3.5. O método de criopreservação

A criopreservação é um método baseado na manutenção do material vegetal em condição de redução da divisão celular ou de metabolismo praticamente zero. Para isso, os materiais vegetais dos mais variados tipos (sementes, gemas apicais, embriões somáticos ou zigóticos, pólen, etc.) são submetidos a temperaturas ultrabaixas em NL a  $-196^{\circ}\text{C}$ , ou em sua fase de vapor (de  $-150^{\circ}\text{C}$  a  $-185^{\circ}\text{C}$ ), na presença ou ausência de substâncias crioprotetoras (Engelmann, 2004).

A criopreservação foi desenvolvida para evitar alterações genéticas que podem ocorrer durante a estocagem de culturas *in vitro* por longos períodos (Engelmann, 2004). Até o momento, a criopreservação utilizando diferentes propágulos (sementes ou pólen), bem como materiais clonais e plantas cultivadas *in vitro* (embriões somáticos, culturas de células ou meristemas de plantas *in vitro*), tem sido utilizada para mais de 200 espécies de plantas, incluindo culturas básicas, plantas ameaçadas de extinção e plantas comercialmente importantes, como arroz, banana, batata, cana-de-açúcar, maçã, mandioca, morango, alho e amora (Benson, 2008; Wang et al., 2012; 2014). Na prática, a conservação mais longa em temperaturas criogênicas conhecida até o momento foi de 28 anos para meristemas de morango e plântulas de ervilha germinadas *in vitro* (Caswell e Kartha, 2009) e de 27 anos para cultura de células de alfafa (Volkova et al., 2015).

A conservação de germoplasma em um banco criogênico é mais barata que os outros sistemas disponíveis *in vitro*, como a conservação *in vitro* por cultivo mínimo. Na criopreservação, o material criopreservado necessita de pequeno espaço para armazenamento, requer pouca manutenção, dispensando subcultivos, e a variação somaclonal é reduzida (Sakai e Engelmann, 2007; Li e Pritchard, 2009). A utilização do banco criogênico permite o armazenamento do material biológico por tempo indefinido, com baixo risco ao material conservado,

uma vez que o metabolismo celular é tão reduzido que a deterioração biológica é praticamente paralisada. A estabilidade genética e as características fenotípicas do material são mantidas (Engelmann et al., 2008).

Independentemente da técnica utilizada, de modo geral, o processo de criopreservação é constituído basicamente por cinco fases distintas: a) pré-tratamento dos explantes; b) congelamento e armazenamento em NL; c) descongelamento; d) restabelecimento dos explantes criopreservados; e e) determinação da viabilidade. Para o desenvolvimento de um sistema de criopreservação para uma espécie, incluindo as orquídeas, estas fases devem ser otimizadas (Engelmann, 2004).

Os métodos de criopreservação são diferentes e incluem os métodos convencionais ou clássicos, baseados na desidratação induzida pelo congelamento lento das células (mais dispendiosos em equipamentos), como também por métodos baseados na vitrificação (Sakai et al., 2008).

As sete diferentes técnicas de criopreservação baseadas na desidratação incluem o encapsulamento-desidratação, a vitrificação, o encapsulamento-vitrificação, a desidratação, o pré-crescimento, o pré-crescimento-desidratação e a vitrificação em gotículas (Engelmann, 2004).

As técnicas de criopreservação utilizadas neste trabalho foram a vitrificação e a desidratação.

### **3.5.1. Técnica de criopreservação por vitrificação**

O método preferível para a criopreservação é a vitrificação por ser de fácil condução, apresentar alta percentagem de restabelecimento do material vegetal, não requerer o uso de equipamentos programáveis ou ultrafreezers (-80°C), considerados caros. O uso de soluções crioprotetoras altamente concentradas permite a solidificação das estruturas de forma que se mantenham viscosas e estáveis, evitando a formação de cristais de gelo (Engelmann, 2004). Além disso, a criopreservação por vitrificação tem provado ser uma eficiente técnica para a eliminação de patógenos de plantas (Ding et al., 2008, Wang e Valkonen, 2009).

De modo geral, este procedimento consiste nos seguintes passos (Figura 1):



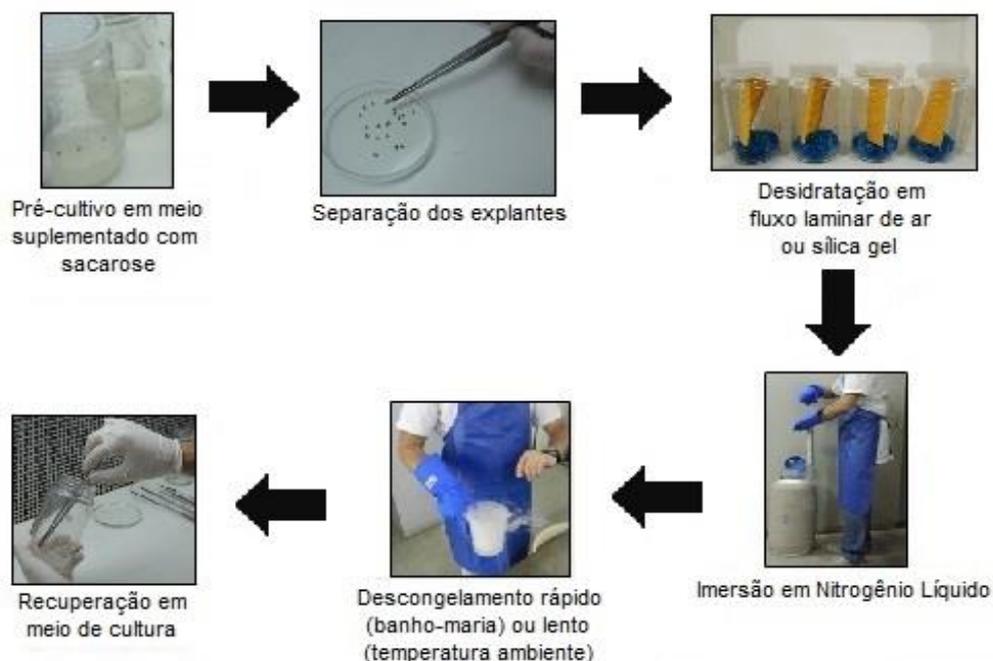
**Figura 1.** Protocolo de criopreservação pelo método de vitrificação (Fotos do autor).

Essa técnica já foi utilizada com sucesso para armazenamento em NL de mais de 200 espécies vegetais e variedades, entre elas: abacaxi, álamo, alho, ameixa, amendoim, amora, arroz, aspargo, banana, batata-doce, batata, beterraba, caqui, cenoura, centeio, cravo, crisântemo, ginseng, groselha, hortelã, inhame, jaca, maçã, mandioca, orquídeas, videira e outros (Sakai et al., 2008).

### 3.5.2. Técnica de criopreservação por desidratação

A desidratação é o processo mais simples de criopreservação. Ele consiste em desidratar explantes (em cabine de fluxo laminar de ar, sílica gel ou soluções salinas saturadas), em seguida, congelá-los rapidamente por imersão direta em NL. Esta técnica é usada principalmente em sementes, embriões zigóticos ou eixos embrionários extraídos de sementes. Em geral, boa sobrevivência é obtida quando as amostras são criopreservadas entre 10% e 20% de teor de água (Engelmann, 1997).

De modo geral, este procedimento consiste nos seguintes passos (Figura 2):



**Figura 2.** Protocolo de criopreservação pelo método de desidratação (Fotos do autor).

### 3.6. Criopreservação de sementes de orquídeas

Pritchard (1984) foi o primeiro a utilizar a criopreservação com NL na conservação de sementes de orquídeas terrestres e epífitas com nível de umidade abaixo de 11%. A capacidade de germinação das sementes não se alterou após a criopreservação para a maioria das espécies estudadas.

O material mais utilizado na propagação *in vitro* das orquídeas são as sementes imaturas, o que reduz o risco de contaminação pelo fato de as sementes estarem isoladas em cápsulas fechadas (Arditti, 2008). Essas sementes imaturas têm teor de água mais alto que as sementes maduras, e sua exposição direta em NL pode ser letal, pela formação de gelo intracelular (Hirano et al., 2005a). A criopreservação desses materiais só é possível pela desidratação e aplicação controlada de agentes crioprotetores ou pela combinação de ambos (Engelmann, 2004). As amostras podem ser desidratadas durante o congelamento lento (método de congelamento programado), osmoticamente, numa série de soluções crioprotetoras concentradas (métodos baseados em vitrificação) ou simplesmente sob um fluxo de ar ou sobre sílica-gel (métodos baseados na desidratação) (Popova et al., 2016).

A técnica de vitrificação é o método mais comumente empregado na criopreservação de sementes maduras e sementes imaturas de orquídeas. Este procedimento envolve um passo a passo para a desidratação das amostras com misturas crioprotetoras altamente concentradas, incluindo soluções osmocondicionantes e soluções de vitrificação. Na maioria dos trabalhos publicados, a solução osmocondicionante consiste em 2,0 M de glicerol e 0,4 M de sacarose (Nishizawa et al., 1993), sendo a solução de vitrificação no PVS2 composta por 30% de glicerol, 15% de dimetilsulfóxido, 15% de etileno glicol e 13,7% de sacarose (Sakai et al., 1990).

Até o momento, a criopreservação de sementes de orquídeas imaturas com alta umidade já foi feita em espécies de orquídeas de gêneros como *Bletilla*, *Cymbidium*, *Cyrtopodium*, *Dendrobium*, *Doritis*, *Encyclia*, *Phaius*, *Ponerorchis* e *Vanda*, com germinação variando de 32 a 100% após a criopreservação. Para a maioria das espécies, a desidratação das sementes em soluções crioprotetoras altamente concentradas antes da imersão em NL foi essencial para a sobrevivência após a criopreservação. Já os trabalhos de criopreservação com sementes de orquídeas maduras sugerem que a maioria das sementes de orquídeas com menos de 13% umidade pode ser criopreservada com sucesso pela simples imersão direta em NL após o armazenamento em criotubos, podendo ficar armazenadas por semanas até anos (Popova et al., 2016).

Entretanto, sementes maduras de algumas espécies de orquídeas com elevado teor de água parecem tolerar a exposição direta ao NL. Por exemplo, sementes de *Encyclia cochleata*, com 24% de umidade, foram criopreservadas em criotubos sem qualquer perda de viabilidade (Nikishina et al., 2001). Da mesma forma, sementes maduras de *Bletilla formosana*, com 25% de umidade, apresentaram 68% de germinação ao serem criopreservadas por imersão direta ao NL (Wu et al., 2013).

Curiosamente, sementes de algumas orquídeas podem não suportar a exposição direta ao NL mesmo com baixa umidade. Por exemplo, sementes maduras de *Oncidium flexuosum* (11% de umidade) e um híbrido de *Dendrobium* (13% de umidade) não foram capazes de germinar ou tiveram baixa germinação após imersão direta em NL (Galdiano et al., 2012; 2013). As sementes destas espécies puderam ser criopreservadas pelo método de vitrificação, isto é, usando solução crioprotetora altamente concentrada (PVS2), combinada com

congelamento e descongelamento rápido (Galdiano et al., 2012; 2013; 2014). Mais recentemente, Galdiano et al. (2014) utilizaram a vitrificação para a criopreservação de sementes maduras do gênero *Dendrobium*, híbrido "Dong Yai" (12% de umidade) com a maior taxa de germinação (58%) atingida após duas horas de exposição ao PVS2 (0°C).

Em sua maioria, as sementes de orquídeas são tratadas como ortodoxas, pois sua longevidade é aumentada pela redução do teor de água e da temperatura de armazenamento (Pritchard et al., 1999). No entanto, as sementes de algumas espécies de orquídeas apresentam sensibilidade à desidratação extrema e viabilidade reduzida quando armazenadas com baixa umidade e temperatura. Tais respostas variáveis às condições dos bancos convencionais reforçam a necessidade de uma investigação mais acurada do comportamento do crioarmazenamento de sementes de orquídeas (Pritchard et al., 1999; Merritt et al., 2014).

### **3.7. Estabilidade genética do material preservado**

Poucos trabalhos com conservação *in vitro* abrangem os aspectos relacionados à fidelidade genética do material preservado. A instabilidade genética e as variações somaclonais podem surgir de acordo com a natureza do material vegetal (diferenças nos perfis fenotípicos e genotípicos das plantas) ou mesmo em decorrência do uso de determinadas substâncias crioprotetoras, como o dimetilsulfóxido (DMSO) em determinadas concentrações. Assim, a determinação da integridade genética é necessária após a estocagem em NL (Harding, 2004; Panis e Lambardi, 2006).

Embora as alterações encontradas na estrutura e no grau de metilação do DNA possivelmente sejam devidas ao cultivo *in vitro*, não ao processo de vitrificação, é necessário o monitoramento constante das plantas regeneradas, principalmente aquelas de importância agrônômica, ao atingirem a maturidade reprodutiva (Peredo et al., 2008).

A citometria de fluxo tem sido utilizada com sucesso para monitorar a estabilidade genética de plantas provenientes das técnicas de cultivo *in vitro* (Pinto et al. 2004; Prado et al. 2010; Sopalun et al. 2010), como também plantas

regeneradas após criopreservação (Hirano et al. 2005a; Popova et al. 2009; 2010; Ai et al., 2012).

O conteúdo de DNA nuclear em um cromossomo haploide não replicado é chamado de valor C de DNA. Assim, um núcleo na fase G1 do ciclo celular com duas cópias do genoma não replicado tem valor 2C de DNA (Dolezel e Bartos, 2005). O conhecimento do valor C de DNA é importante para diversos ramos da biologia, como a taxonomia, a ecologia e a genética molecular (Bennet et al., 2000).

De acordo com o Plant DNA C-value Database (2019), 414 espécies de orquídeas têm estimativas para o valor C de DNA. Os resultados sugerem que a família Orchidaceae é, entre as angiospermas, a que tem maior variabilidade nos conteúdos de DNA nuclear, com tamanhos de genoma variando 168 vezes de  $1C = 0,33$  pg em *Trichocentrum morenoi* a  $1C = 55,4$  pg em *Pogonia ophioglossoides* (Leitch et al., 2009).

Não existem estimativas do valor C de DNA para a maioria das espécies de orquídeas brasileiras, indicando a necessidade de pesquisas com esta abordagem. Acredita-se que a falta de dados de citometria de fluxo para a família Orchidaceae esteja relacionada às dificuldades na obtenção de estimativas precisas, possivelmente pela natureza dos tecidos. Os procedimentos utilizados para as estimativas existentes variam muito, dificultando comparações. Além disso, problemas metodológicos, relacionados à interferência de metabólitos secundários, incluindo compostos fenólicos, podem causar alterações nos picos (Leitch et al., 2009).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Setor de Horticultura do Laboratório de Fitotecnia (LFIT) e em Casa de Vegetação, na Unidade de Apoio à Pesquisa (UAP), do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF).

Dois diferentes métodos de criopreservação foram utilizados nas espécies de orquídeas do gênero *Cattleya* neste trabalho, a vitrificação e a desidratação. Para o híbrido *C. harrisoniana* x *C. walkeriana* e para as espécies *C. guttata*, *C. tigrina*, *C. amethystoglossa* e *C. loddigesii* foi utilizada a vitrificação em PVS2, já para as espécies *C. amethystoglossa*, *C. lueddemanniana* e *C. warneri* foi usada a desidratação em sílica gel.

### 4.1. Experimentos de criopreservação pela técnica de vitrificação

#### 4.1.1. Material vegetal

Como material vegetal, foram utilizadas sementes imaturas do híbrido de *C. harrisoniana* x *C. walkeriana*, *C. tigrina*, *C. amethystoglossa* e *C. loddigesii* e sementes maduras de *C. guttata*, provenientes do Orquidário Caliman, localizado em Venda Nova do Imigrante - ES.

#### 4.1.2. Obtenção e caracterização das sementes

As flores de *C. harrisoniana* foram polinizadas com pólen de *C. walkeriana*, as flores de *C. tigrina* rubra, *C. amethystoglossa* tipo, *C. loddigesii* tipo foram polinizadas com pólen de outra planta da mesma espécie e variedade e as flores de *C. guttata* tipo foram autopolinizadas. Após quatro, cinco e seis meses, as cápsulas foram coletadas e as sementes, utilizadas nos experimentos de criopreservação. Após quatro meses, foram coletadas três cápsulas do cruzamento *C. amethystoglossa* tipo x *C. amethystoglossa* tipo. Após cinco meses, foi coletada uma cápsula de cada cruzamento entre *C. harrisoniana* x *C. walkeriana*, de *C. tigrina* rubra x *C. tigrina* rubra e de *C. guttata* tipo x self. Após seis meses, foram coletadas duas cápsulas do cruzamento *C. loddigesii* tipo x *C. loddigesii* tipo. Apenas a cápsula contendo as sementes maduras de *C. guttata* já estava aberta, ficando armazenada em geladeira (4°C) por 30 dias, até a condução do experimento. As sementes imaturas do híbrido *C. harrisoniana* x *C. walkeriana* e de *C. tigrina* foram armazenadas em placa de Petri estéril em geladeira (4°C) por 48 horas, até a condução do experimento.

Uma amostra das sementes foi utilizada para o teste de viabilidade inicial e outra para a determinação do teor de água inicial. O teste de viabilidade consistiu em deixar uma amostra de sementes em solução de 1% de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (Vetec®) por 24 horas à temperatura de 27±2°C, no escuro (Singh, 1999). As sementes que apresentaram coloração vermelha foram consideradas viáveis e as demais sementes com colorações variando do laranja ao creme foram consideradas inviáveis. O teor de água inicial foi determinado em estufa (Fanem®) a 103°C, por 17 horas (Pritchard e Seaton, 1993), com o resultado expresso em porcentagem de massa da matéria fresca das sementes.

As características gerais das cápsulas (Figura 3) e das sementes (Figura 4) do híbrido de *C. harrisoniana* x *C. walkeriana*, de *C. tigrina* e *C. guttata* estão sumarizadas na Tabela 2. O teste de viabilidade inicial das sementes do híbrido de *C. harrisoniana* x *C. walkeriana*, *C. tigrina* e *C. guttata* pelo método do tetrazólio apresentou taxas de 79,00%, 47,40% e 88,25%, respectivamente, e o teor de água das sementes antes da criopreservação foi de 65,60%, 49,35% e 6,15%, respectivamente.



**Figura 3.** Aspecto morfológico das cápsulas do (A) híbrido *C. harrisoniana* x *C. walkeriana*, (B) *C. tigrina* e (C) *C. guttata* utilizadas no experimento. Barras = 1,0 cm. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.



**Figura 4.** Aspecto morfológico das sementes do (A) híbrido *C. harrisoniana* x *C. walkeriana*, (B) *C. tigrina* e (C) *C. guttata* coradas pelo método do tetrazólio. Barras = 0,1 mm (A e C) e 0,5 mm (B). Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.

**Tabela 2.** Características biométricas e fisiológicas das cápsulas e das sementes do híbrido de *C. harrisoniana* x *C. walkeriana*, *C. tigrina* e *C. guttata* utilizadas no experimento. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.

Características avaliadas	Dimensões / Valores		
	<i>C. harrisoniana</i>	<i>C. tigrina</i>	<i>C. guttata</i>
	x <i>C. walkeriana</i>		
Comprimento da cápsula (cm)	4,06	4,50	-
Largura da cápsula (cm)	3,16	2,90	-
Massa da cápsula fechada (g)	16,20	13,21	-
Massa das sementes (g)	3,33	1,61	-
Teor de água das sementes (%)	65,6	49,35	6,15
Viabilidade das sementes pelo método do tetrazólio (%)	79,0	47,4	88,25

As características gerais das cápsulas (Figura 5) e das sementes de *C. amethystoglossa* estão sumarizadas na Tabela 3. O teste de viabilidade inicial das sementes de *C. amethystoglossa* pelo método do tetrazólio apresentou taxas de

80,2%, 44,7% e 93,8%, respectivamente, e o teor de água das sementes antes da criopreservação foi de 67,9%, 49,4% e 33,0%, respectivamente.

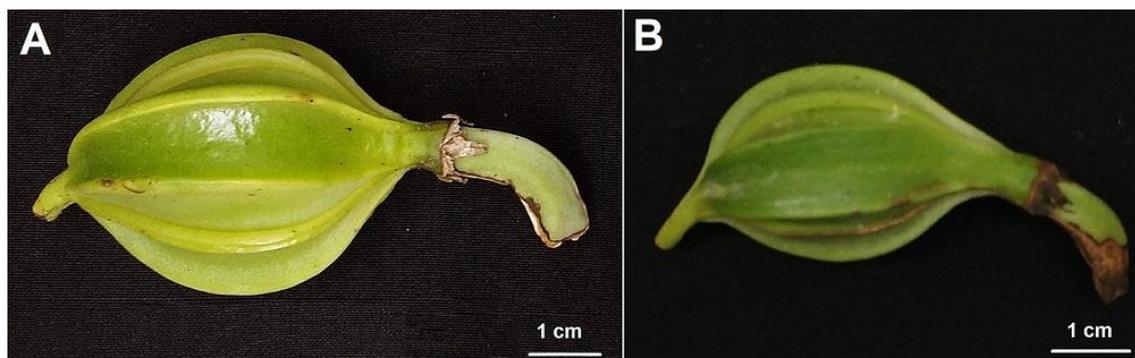


**Figura 5.** Aspecto morfológico das cápsulas de *C. amethystoglossa* utilizadas no experimento. (A) Cápsula 1 - Sementes com teor de água de 67,9%; (B) Cápsula 2 - Sementes com teor de água de 49,4%; (C) Cápsula 3 - Sementes com teor de água de 33,0%. Barras = 1,0 cm. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.

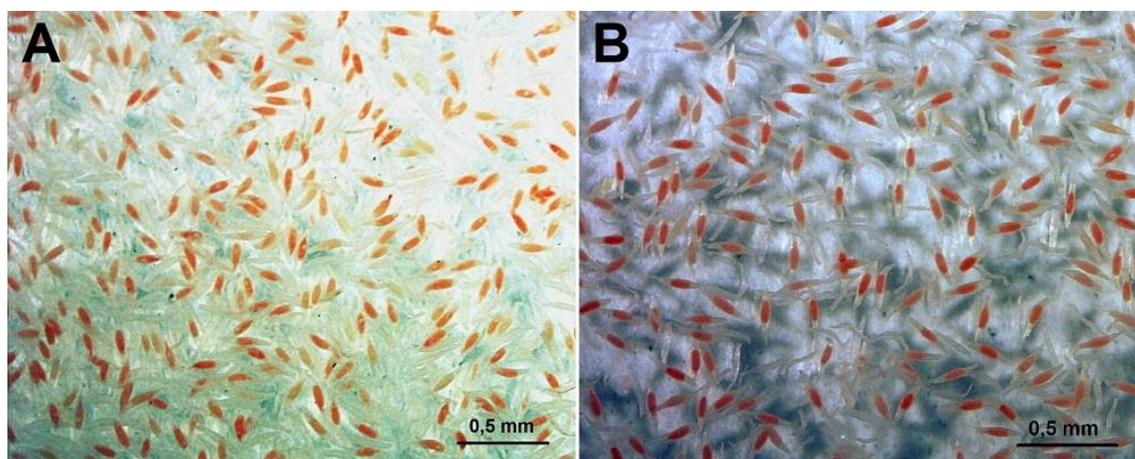
**Tabela 3.** Características biométricas e fisiológicas das cápsulas e das sementes de *C. amethystoglossa* utilizadas no experimento. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.

Características avaliadas	Dimensões/valores		
	<i>C. amethystoglossa</i> (Cápsula 1)	<i>C. amethystoglossa</i> (Cápsula 2)	<i>C. amethystoglossa</i> (Cápsula 3)
Comprimento da cápsula (cm)	4,81	3,91	3,76
Largura da cápsula (cm)	3,38	2,72	3,04
Massa da cápsula fechada (g)	21,24	11,62	13,61
Massa das sementes (g)	4,71	1,41	1,85
Teor de água das sementes (%)	67,9	49,4	33,0
Viabilidade das sementes pelo método do tetrazólio (%)	80,2	44,7	93,8

As características gerais das cápsulas (Figura 6) e das sementes (Figura 7) de *C. loddigesii* estão sumarizadas na Tabela 4. O teste de viabilidade inicial das sementes de *C. loddigesii* pelo método do tetrazólio apresentou taxas de 71,3% e 92,5%, respectivamente, e o teor de água das sementes antes da criopreservação foi de 55,9% e 23,8%, respectivamente.



**Figura 6.** Aspecto morfológico das cápsulas de *C. loddigesii* utilizadas no experimento. (A) Cápsula 1 - Sementes com teor de água de 55,9%; (B) Cápsula 2 - Sementes com teor de água de 23,8%. Barras = 1,0 cm. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.



**Figura 7.** Aspecto morfológico das sementes de *C. loddigesii* utilizadas no experimento, coradas pelo método do tetrazólio. (A) Sementes da cápsula 1, com teor de água de 55,9% e viabilidade de 71,3%; (B) Sementes da cápsula 2, com teor de água de 23,8% e viabilidade de 92,5%. Barras = 0,5 mm. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.

**Tabela 4.** Características biométricas e fisiológicas das cápsulas e das sementes de *C. loddigesii* utilizadas no experimento. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.

Características avaliadas	Dimensões/valores	
	<i>C. loddigesii</i> (Cápsula 1)	<i>C. loddigesii</i> (Cápsula 2)
Comprimento da cápsula (cm)	4,85	4,29
Largura da cápsula (cm)	3,49	3,01
Massa da cápsula fechada (g)	21,61	12,96
Massa das sementes (g)	3,47	1,90
Teor de água das sementes (%)	55,9	23,8
Viabilidade das sementes pelo método do tetrazólio (%)	71,3	92,5

### 4.1.3. Criopreservação das sementes

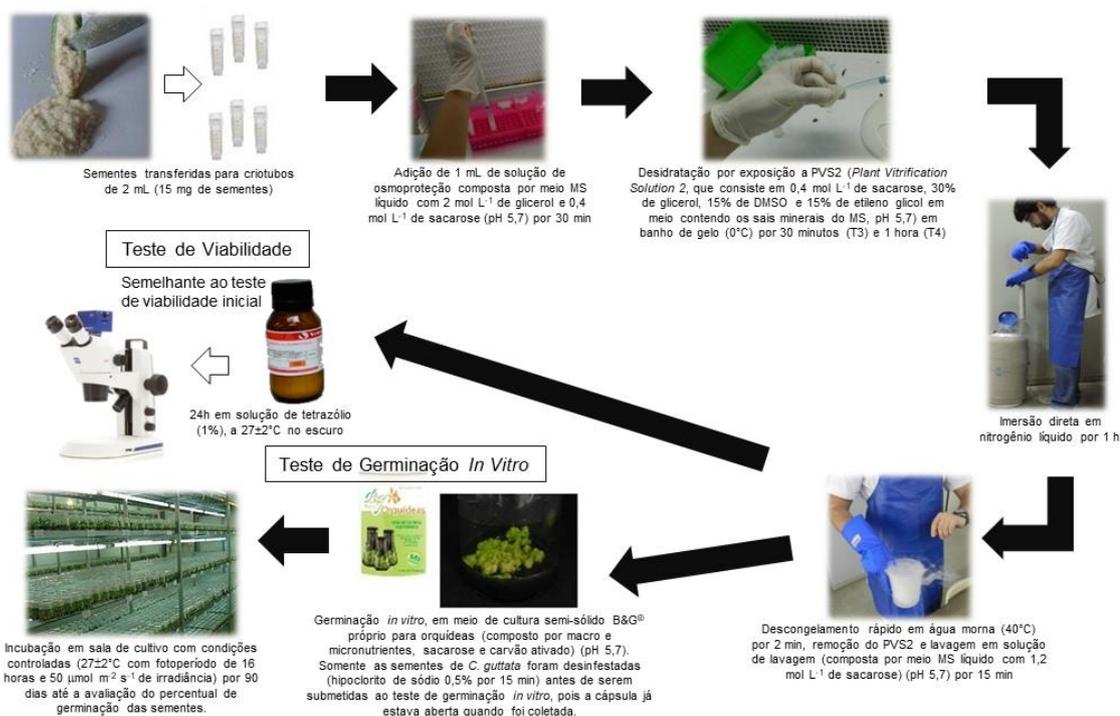
Para cada cápsula contendo os lotes de sementes, o experimento de criopreservação foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com cinco tratamentos e seis repetições (Tabela 5). Cada repetição foi composta por um criotubo com 2 mL de volume contendo 15 mg de sementes. Cada 15 mg de sementes equivale a, aproximadamente, 5 mil sementes de *C. loddigesii*, 12 mil sementes do híbrido *C. harrisoniana* x *C. walkeriana*, 15 mil sementes de *C. tigrina* e de *C. guttata* e 20 mil sementes de *C. amethystoglossa*. Das seis repetições de cada tratamento, uma foi utilizada no teste de viabilidade e as outras cinco utilizadas na germinação *in vitro*.

**Tabela 5.** Tratamentos utilizados no experimento de criopreservação de sementes imaturas do híbrido de *C. harrisoniana* x *C. walkeriana*, *C. tigrina*, *C. amethystoglossa* e *C. loddigesii* e sementes maduras de *C. guttata*. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.

Tratamentos
T1 - Germinação direta (Controle 1)
T2 - uma hora em PVS2 sem NL (Controle 2)
T3 - 30 minutos em PVS2 + NL
T4 - uma hora em PVS2 + NL
T5 - Imersão direta em NL sem PVS2

O procedimento de vitrificação (T3 e T4) (Figura 8) consistiu na adição de 1 mL de solução de osmoproteção (SO), composta por meio MS líquido (Murashige e Skoog, 1962) com 2 mol L<sup>-1</sup> de glicerol e 0,4 mol L<sup>-1</sup> de sacarose (pH 5,7), por 30 minutos a 27°C. O excesso desta solução foi removido e, em seguida, as sementes foram desidratadas em 1 mL de PVS2 por criotubo, nos tempos de 30 minutos (T3) e uma hora (T4) em banho de gelo (0°C), antes de serem imersas em NL por uma hora. O PVS2 consiste em 0,4 mol L<sup>-1</sup> de sacarose, 30% de glicerol, 15% de DMSO e 15% de etileno glicol em meio contendo os sais minerais do MS, pH 5,7. Após uma hora em NL, os criotubos foram rapidamente aquecidos a 40°C por 2 minutos, o PVS2 foi removido dos

criotubos e adicionado, por criotubo, 1 mL de solução de lavagem (SL) composta por meio MS líquido com  $1,2 \text{ mol L}^{-1}$  de sacarose (pH 5,7). As sementes permaneceram 15 minutos na SL e, em seguida, foram feitos os testes de viabilidade e germinação *in vitro*.



**Figura 8.** Fluxograma do procedimento criopreservação por vitrificação (T3 e T4) de sementes imaturas do híbrido de *C. harrisoniana* x *C. walkeriana*, *C. tigrina*, *C. amethystoglossa* e *C. loddigesii* e sementes maduras de *C. guttata*. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.

#### 4.1.4. Teste de viabilidade das sementes criopreservadas

O teste de viabilidade das sementes oriundas do experimento de criopreservação prosseguiu de forma semelhante ao teste de viabilidade inicial, sendo que, após 24 horas em solução de 1% de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio, as sementes de cada criotubo foram divididas em cinco placas de Petri para que pudessem ser avaliadas. Cada placa de Petri consistiu de uma repetição, totalizando cinco repetições para cada tratamento. Apenas as sementes do híbrido de *C. harrisoniana* x *C. walkeriana*, *C. tigrina* e *C. guttata* foram submetidas ao teste de viabilidade.

#### 4.1.5. Germinação *in vitro* das sementes

As sementes dos cinco tratamentos de todos os lotes foram germinadas *in vitro* em frascos (65 x 125 mm) contendo 40 mL de meio de cultura B&G Orquídeas<sup>®</sup>, que contém macro e micronutrientes, sacarose e carvão ativado, pH aferido para 5,7, se solidificado com 10 g L<sup>-1</sup> de ágar VETEC<sup>®</sup>. Cada frasco correspondeu a um criotubo.

As sementes maduras de *C. guttata* foram desinfestadas antes de serem submetidas ao teste de germinação *in vitro*, pois a cápsula já estava aberta quando foi coletada. A desinfestação das sementes foi feita em hipoclorito de sódio (0,5%) por 15 minutos.

Os frascos foram incubados em sala de cultivo com condições controladas (27±2°C com fotoperíodo de 16 horas e 50 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> de irradiância fornecidos por lâmpadas fluorescentes Osram<sup>®</sup> luz do dia) por 90 dias até a avaliação do percentual de germinação das sementes. Para cada espécie ou híbrido, o experimento foi conduzido em DIC com cinco tratamentos e cinco repetições. Cada repetição consistiu de um frasco de cultivo contendo 15 mg de sementes.

#### 4.1.6. Crescimento *in vitro* das plântulas

Após a avaliação de germinação, as plântulas formadas em cada tratamento foram individualizadas em novos frascos contendo o mesmo meio de cultura, permanecendo neste meio por mais nove meses. Após 12 meses de cultivo *in vitro*, as plântulas seguiram para análises biométricas e fisiológicas, citometria de fluxo e aclimatização.

Este experimento foi conduzido em DIC com os cinco tratamentos da fase anterior e dez repetições. Cada repetição foi constituída por um frasco contendo dez plântulas escolhidas aleatoriamente. Três frascos de cada tratamento foram utilizados para as análises biométricas e fisiológicas, um frasco foi utilizado para a citometria de fluxo e seis seguiram para aclimatização.

##### 4.1.6.1. Análises biométricas

Quinze plantas de cada tratamento, escolhidas aleatoriamente, foram submetidas às avaliações de variáveis biométricas referentes a número de folhas, área foliar, volume radicular, massa da matéria fresca e massa da matéria seca.

A área foliar foi medida com o auxílio de um medidor de área foliar, modelo Licor 3100 (Li-Cor, 1996). O volume radicular foi determinado pelo deslocamento de água pela raiz em uma proveta. Para a massa da matéria fresca, foi feita a pesagem individual das plantas em balança analítica. Após a secagem das plantas em estufa a 70°C, até atingirem massa constante, foi feita a pesagem individual em balança analítica para massa da matéria seca.

#### **4.1.6.2. Análises fisiológicas**

Quinze plantas de cada tratamento, escolhidas aleatoriamente, foram submetidas às avaliações fisiológicas referentes ao índice de verde, à relação  $F_v/F_m$  e ao PI. A intensidade de cor verde foi avaliada pelo medidor portátil de clorofila SPAD-502 Chlorophyll Meter® (Minolta, Japão), tendo sido feitas três leituras no segundo par de folhas fotossinteticamente ativas e, em seguida, obtida a média. Na avaliação da eficiência fotoquímica, o rendimento quântico máximo do fotossistema II (PSII) ( $F_v/F_m$ ) e o PI foram determinados no segundo par de folhas fotossinteticamente ativas por um fluorímetro não modulado, modelo Pocket PEA Chlorophyll Fluorimeter® (Hansatech Instruments - King's Lynn, Norfolk). Durante as medidas, foi utilizada uma pinça para a adaptação dos cloroplastos ao escuro por 20 minutos, para que todos os centros de reação do fotossistema II (PSII) adquirissem a condição de “abertos”, e a perda de calor fosse mínima (Strauss et al., 2006).

#### **4.1.7. Aclimatização das plantas**

As plantas com 12 meses de cultivo *in vitro* foram transferidas para bandejas de polipropileno de 84 células (35 mL/célula), com esfagno (Big Moss®) como substrato. A aclimatização foi feita em casa de vegetação, com cobertura de plástico (150 Micras) e tela de sombreamento (35%). As plantas foram irrigadas diariamente e adubadas semanalmente com uma solução de 5 mL L<sup>-1</sup> de adubo

B&G Orquídeas® (3,5 mL da solução/célula). O monitoramento da temperatura da casa de vegetação foi diário, com média de  $29\pm 6^{\circ}\text{C}$ .

A aclimatização foi conduzida em delineamento em blocos casualizados (DBC), com cinco tratamentos e quatro blocos. Cada bloco foi constituído por cinco plantas escolhidas aleatoriamente. Ao final de seis meses de aclimatização, as variáveis biométricas e fisiológicas já descritas foram avaliadas em três blocos de cada tratamento. As plantas do bloco restante foram coletadas para as análises anatômicas.

#### **4.1.8. Avaliação da estabilidade genética das plantas em citômetro de fluxo**

A avaliação da estabilidade genética das plantas foi feita pela obtenção do conteúdo relativo de DNA de plantas após um ano de cultivo *in vitro*, provenientes de sementes criopreservadas e de sementes não criopreservadas (controle), obtido com auxílio de um citômetro de fluxo CytoFLEX (Beckman Coulter, CA, EUA). Suspensões de núcleos de folhas jovens foram preparadas pela picagem de cerca de 20-30 mg de folhas jovens com uma lâmina de aço descartável em 1 mL de tampão de isolamento Woody Plant Buffer (WPB) (Loureiro et al., 2007). A suspensão gerada foi aspirada por meio de duas camadas de gaze, com uma pipeta de plástico, filtrada em membrana de nylon (com malha de 50  $\mu\text{m}$ ), para a remoção de fragmentos de células e restos de tecidos, e colocada em tubos de poliestireno. Em seguida, foram adicionados 25  $\mu\text{L}$  de solução de iodeto de propídeo ( $1\text{ mg mL}^{-1}$ , Sigma Chemical Company, EUA) e 5 mL de RNase (Amresco, USA) em cada amostra, para corar o DNA. As amostras foram incubadas a  $4^{\circ}\text{C}$  no escuro e, após uma hora, analisadas no citômetro de fluxo.

Foram feitas três repetições e, pelo menos, 10.000 núcleos foram analisados para a quantificação da emissão da fluorescência, com o uso do citômetro de fluxo. Como padrão interno, foi utilizada a espécie *Glycine max* com conteúdo de DNA  $2C = 2,50\text{pg}$  (Dolezel et al., 1998). Os histogramas foram gerados e analisados pelo programa CytExpert 2.0, e o conteúdo de DNA (pg) calculado segundo fórmula proposta por Dolezel e Bartos (2005).

#### **4.1.9. Análise anatômica das plantas em microscópio óptico**

Para as análises anatômicas em microscópio óptico, foram utilizados tecidos de folha e raiz de plantas ao final de seis meses de aclimatização, provenientes de sementes criopreservadas e de sementes não criopreservadas. As amostras de folha e raiz foram fixadas em uma solução aquosa contendo glutaraldeído 2,5%, formaldeído 4,0% e tampão cacodilato de sódio 0,05 M (pH 7,1), em geladeira por, no mínimo, 24 horas. Em seguida, tais amostras foram lavadas em uma solução de tampão cacodilato de sódio 0,05 M (pH 7,1) por uma hora à temperatura ambiente e desidratadas em série alcoólica (10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% e duas vezes em 100%) por uma hora em cada etapa. Após a desidratação em série alcoólica, as amostras foram infiltradas gradativamente com historesina, usando uma série crescente de historesina em etanol 100% (1:3; 1:2; 1:1; 2:1 e 3:1) por quatro horas em cada etapa. A inclusão do material foi feita em solução de historesina pura com solução endurecedora por 48 horas.

Secções de 5 µm de espessura foram obtidas em micrótomo rotativo (Leica RM2235), dispostas com auxílio de uma pinça em lâminas com uma gota de água e coradas com azul de toluidina (1,0%). As observações foram feitas no microscópio óptico Olympus BX60, e as imagens capturadas por uma câmera digital Q-Color 3 (Olympus) acoplada ao microscópio, com o auxílio do software cellSens Standard 1.8 (Olympus).

### **4.2. Experimento de criopreservação pela técnica de desidratação**

#### **4.2.1. Material vegetal**

Como material vegetal, foram utilizadas sementes de *C. amethystoglossa*, *C. lueddemanniana* e *C. warneri*, provenientes do Orquidário Caliman, localizado em Venda Nova do Imigrante - ES.

#### **4.2.2. Obtenção e caracterização das sementes**

As flores de *C. amethystoglossa*, *C. lueddemanniana* e *C. warneri* foram polinizadas com pólen de outra planta da mesma variedade. Após 180 dias, foram coletadas duas cápsulas de *C. warneri* (*C. warneri* tipo x *C. warneri* tipo) e após 220 dias, foram coletadas três cápsulas de *C. amethystoglossa* (*C. amethystoglossa* tipo x *C. amethystoglossa* tipo) e duas cápsulas de *C. lueddemanniana* (*C. lueddemanniana* tipo x *C. lueddemanniana* tipo), tendo as sementes com diferentes teores de umidade sido utilizadas no experimento de criopreservação.

Uma amostra das sementes foi utilizada para o teste de viabilidade inicial e outra para a determinação do teor de água inicial. O teste de viabilidade consistiu em deixar uma amostra de sementes em uma solução de 1% de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (Vetec®) por 24 horas à temperatura de  $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ , no escuro (Singh, 1999). As sementes que apresentaram coloração vermelha foram consideradas viáveis e as demais sementes com colorações variando do laranja ao creme foram consideradas inviáveis. O teor de água inicial foi determinado em estufa (Fanem®) a  $103^{\circ}\text{C}$ , por 17 horas (Pritchard e Seaton, 1993), com o resultado expresso em porcentagem de massa da matéria fresca das sementes.

As características gerais das cápsulas (Figuras 9, 11 e 13) e das sementes (Figuras 10, 12 e 14) estão sumarizadas nas Tabelas 6, 7 e 8. O teste de viabilidade inicial das sementes pelo método do tetrazólio apresentou taxas de 80,0%, 89,67% e 69,3% para *C. amethystoglossa*, de 47,2% e 79,3% para *C. lueddemanniana* e de 59,8% e 72,2% para *C. warneri*. O teor de água das sementes antes da criopreservação foi de 50,5%, 41,8% e 40,9% para *C. amethystoglossa*, de 80,5% e 16,4% para *C. lueddemanniana* e de 38,9% e 21,4% para *C. warneri*.



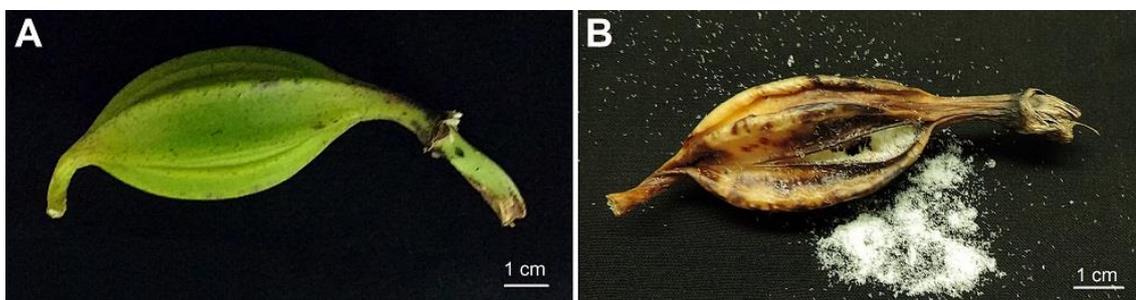
**Figura 9.** Aspecto morfológico das cápsulas de *C. amethystoglossa* utilizadas no experimento. (A) Cápsula 1 - Sementes com teor de água de 50,5%; (B) Cápsula 2 - Sementes com teor de água de 41,8%; (C) Cápsula 3 - Sementes com teor de água de 40,9%. Barras = 1,0 cm. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.



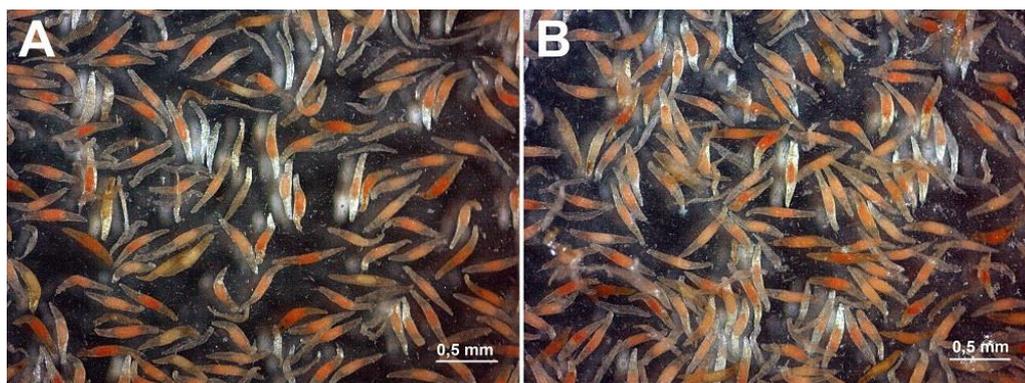
**Figura 10.** Aspecto morfológico das sementes de *C. amethystoglossa* utilizadas no experimento, coradas pelo método do tetrazólio. (A) Sementes da cápsula 1, com teor de água de 50,5% e viabilidade de 80,0%; (B) Sementes da cápsula 2, com teor de água de 41,8% e viabilidade de 89,6%; (C) Sementes da cápsula 3, com teor de água de 40,9% e viabilidade de 69,3%. Barras = 0,5 mm. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.

**Tabela 6.** Características biométricas e fisiológicas das cápsulas e das sementes de *C. amethystoglossa* utilizadas no experimento. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.

Características avaliadas	Cápsula 1	Cápsula 2	Cápsula 3
	Dimensões / Valores		
Comprimento da cápsula (cm)	4,3	5,87	3,87
Largura da cápsula (cm)	3,41	3,89	2,93
Massa inicial das sementes (g)	1,285	3,180	0,637
Teor de água inicial das sementes (%)	50,5	41,8	40,9
Viabilidade inicial das sementes (%)	80,0	89,6	69,3



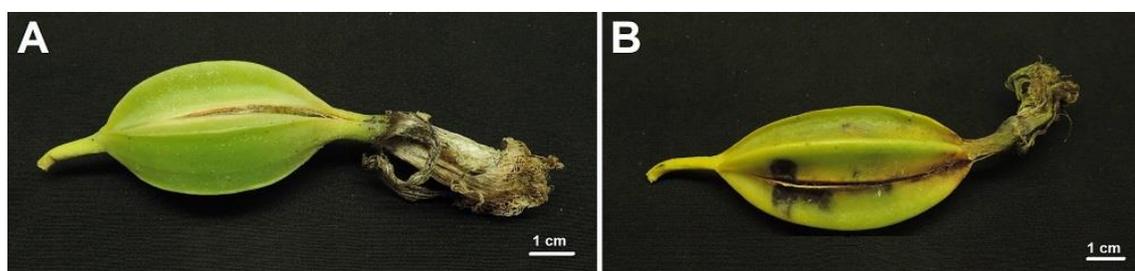
**Figura 11.** Aspecto morfológico das cápsulas de *C. lueddemanniana* utilizadas no experimento. (A) Cápsula 1 - Sementes com teor de água de 80,5%; (B) Cápsula 2 - Sementes com teor de água de 16,4%. Barras = 1,0 cm. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.



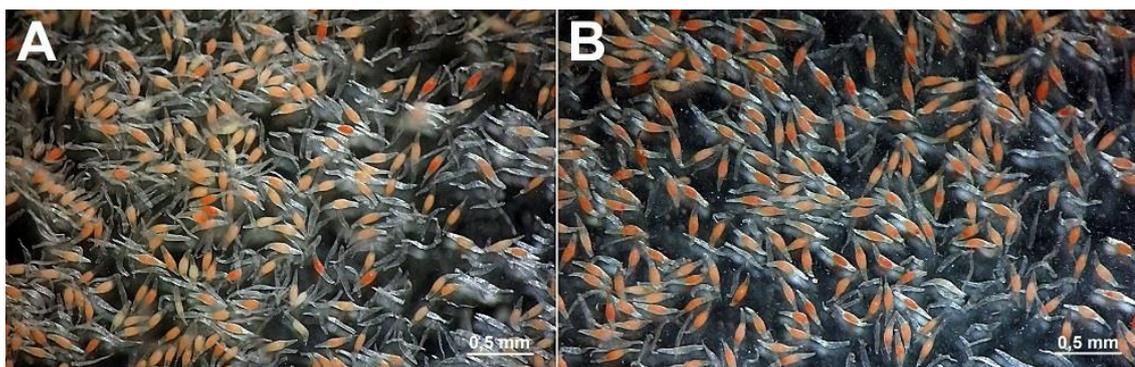
**Figura 12.** Aspecto morfológico das sementes de *C. lueddemanniana* utilizadas no experimento, coradas pelo método do tetrazólio. (A) Sementes da cápsula 1, com teor de água de 80,5% e viabilidade de 47,2%; (B) Sementes da cápsula 2, com teor de água de 16,4% e viabilidade de 79,3%. Barras = 0,5 mm. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.

**Tabela 7.** Características biométricas e fisiológicas das cápsulas e das sementes de *C. lueddemanniana* utilizadas no experimento. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.

Características avaliadas	Cápsula 1	Cápsula 2
	Dimensões / Valores	
Comprimento da cápsula (cm)	6,11	5,38
Largura da cápsula (cm)	3,15	3,43
Massa inicial das sementes (g)	4,503	1,611
Teor de água inicial das sementes (%)	80,5	16,4
Viabilidade inicial das sementes (%)	47,2	79,3



**Figura 13.** Aspecto morfológico das cápsulas de *C. warneri* utilizadas no experimento. (A) Cápsula 1 - Sementes com teor de água de 38,9%; (B) Cápsula 2 - Sementes com teor de água de 21,4%. Barras = 1,0 cm. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.



**Figura 14.** Aspecto morfológico das sementes de *C. warneri* utilizadas no experimento, coradas pelo método do tetrazólio. (A) Sementes da cápsula 1, com teor de água de 38,9% e viabilidade de 59,8%; (B) Sementes da cápsula 2, com teor de água de 21,4% e viabilidade de 72,2%. Barras = 0,5 mm. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.

**Tabela 8.** Características biométricas e fisiológicas das cápsulas e das sementes de *C. warneri* utilizadas no experimento. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.

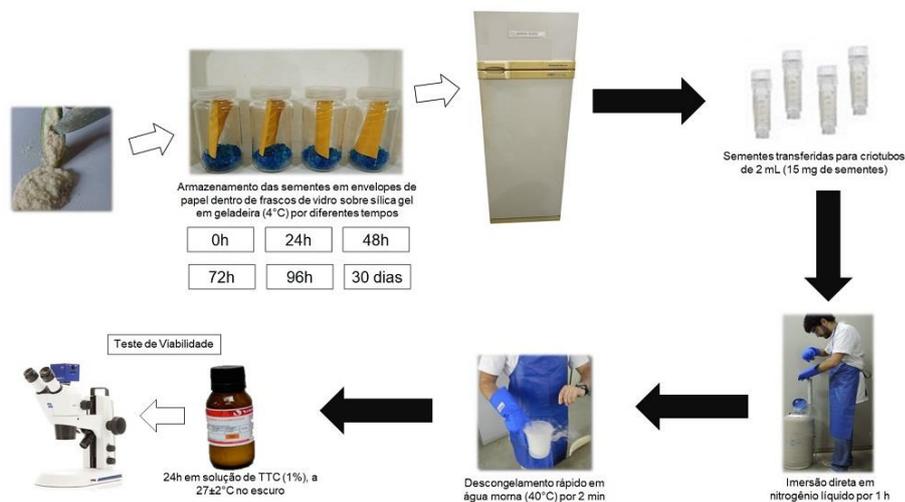
Características avaliadas	Cápsula 1	Cápsula 2
	Dimensões / Valores	
Comprimento da cápsula (cm)	5,64	7,68
Largura da cápsula (cm)	3,36	3,60
Massa inicial das sementes (g)	0,573	1,985
Teor de água inicial das sementes (%)	38,9	21,4
Viabilidade inicial das sementes (%)	59,8	72,2

#### 4.2.3. Desidratação e criopreservação das sementes

Para cada cápsula de *C. amethystoglossa*, *C. lueddemanniana* e *C. warneri*, o experimento de criopreservação foi conduzido em DIC com seis tratamentos e quatro repetições. Cada repetição foi composta por um criotubo com 2 mL de volume contendo 15 mg de sementes.

O procedimento de desidratação (Figura 15) das sementes consistiu no armazenamento em envelopes de papel dentro de frascos de vidro sobre sílica gel (4°C), nos tempos 0h (T1), 24h (T2), 48h (T3), 72h (T4), 96h (T5) e 30 dias (T6). Após a desidratação, as sementes foram colocadas em criotubos e imersas em nitrogênio líquido (NL) por uma hora. Após a imersão em NL, os criotubos

foram rapidamente aquecidos a 40°C por 2 minutos e, em seguida, encaminhados para o teste de viabilidade.



**Figura 15.** Fluxograma do procedimento criopreservação por desidratação de sementes imaturas de *C. amethystoglossa*, *C. lueddemanniana* e *C. warneri*. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.

#### 4.2.4. Teste de viabilidade das sementes criopreservadas

O teste de viabilidade das sementes oriundas do experimento de criopreservação prosseguiu de forma semelhante ao teste de viabilidade inicial. Após as 24 horas em solução de 1% de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (27±2°C) no escuro, as sementes foram transferidas dos criotubos para placas de Petri para que sua taxa de viabilidade pudesse ser avaliada em microscópio estereoscópico. Cada placa de Petri consistiu de uma repetição, totalizando quatro repetições para cada tratamento. As sementes de todos os tratamentos foram submetidas ao teste de viabilidade em tetrazólio.

#### 4.3. Análise estatística dos dados

Para os dados obtidos, de todas as espécies de orquídeas, neste trabalho, primeiramente foram verificadas as pressuposições de normalidade e de homogeneidade de variâncias dos tratamentos, respectivamente, pelos testes de Shapiro Wilk e Bartlett, para que então os dados pudessem ser submetidos à

análise de variância (ANOVA). Em seguida, os dados foram submetidos à comparação de médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os parâmetros foram analisados com o auxílio do programa SISVAR, versão 5.6 (Ferreira, 2011).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Experimentos de criopreservação pela técnica de vitrificação

#### 5.1.1. Viabilidade e germinação *in vitro* das sementes

O teste de viabilidade das sementes do híbrido de *C. harrisoniana* x *C. walkeriana*, *C. tigrina* e *C. guttata* foi feito logo após a criopreservação e correspondeu ao teste de germinação avaliado 90 dias após a criopreservação, para todos os tratamentos (Tabela 9), confirmando a eficácia do método do tetrazólio utilizado neste trabalho. O teste de viabilidade pelo método do tetrazólio tem se mostrado muito útil para a criopreservação de sementes de orquídeas (Hirano et al., 2005; Galdiano et al., 2012; 2017). Neste estudo, este método se revelou seguro e preciso na determinação da viabilidade das sementes. Assim, o método do tetrazólio permite testar a viabilidade de sementes sem a espera do longo tempo até sua germinação.

**Tabela 9.** Viabilidade pelo método do tetrazólio após a criopreservação e germinação das sementes criopreservadas do híbrido de *C. harrisoniana* x *C. walkeriana*, *C. tigrina* e *C. guttata*, 90 dias após o semeio *in vitro*. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.

Tratamento	<i>C. harrisoniana</i>		<i>C. tigrina</i>		<i>C. guttata</i>	
	x					
	<i>C. walkeriana</i>		Viabilidade	Germinação	Viabilidade	Germinação
	Viabilidade (%)	Germinação (%)	(%)	(%)	(%)	(%)
T1	77,60 a	77,24 b	47,40 a	48,78 a	88,25 a	87,80 a
T2	79,00 a	80,52 a	26,40 b	23,03 b	85,50 a	81,20 a
T3	2,80 c	2,10 d	5,00 c	2,12 c	62,50 b	59,30 b
T4	22,40 b	21,43 c	24,80 b	22,76 b	82,50 a	78,00 ab
T5	0,00 c	0,02 d	0,00 c	0,01 c	84,50 a	78,80 a
<b>CV (%)</b>	4,73	3,29	14,77	31,14	6,81	11,35

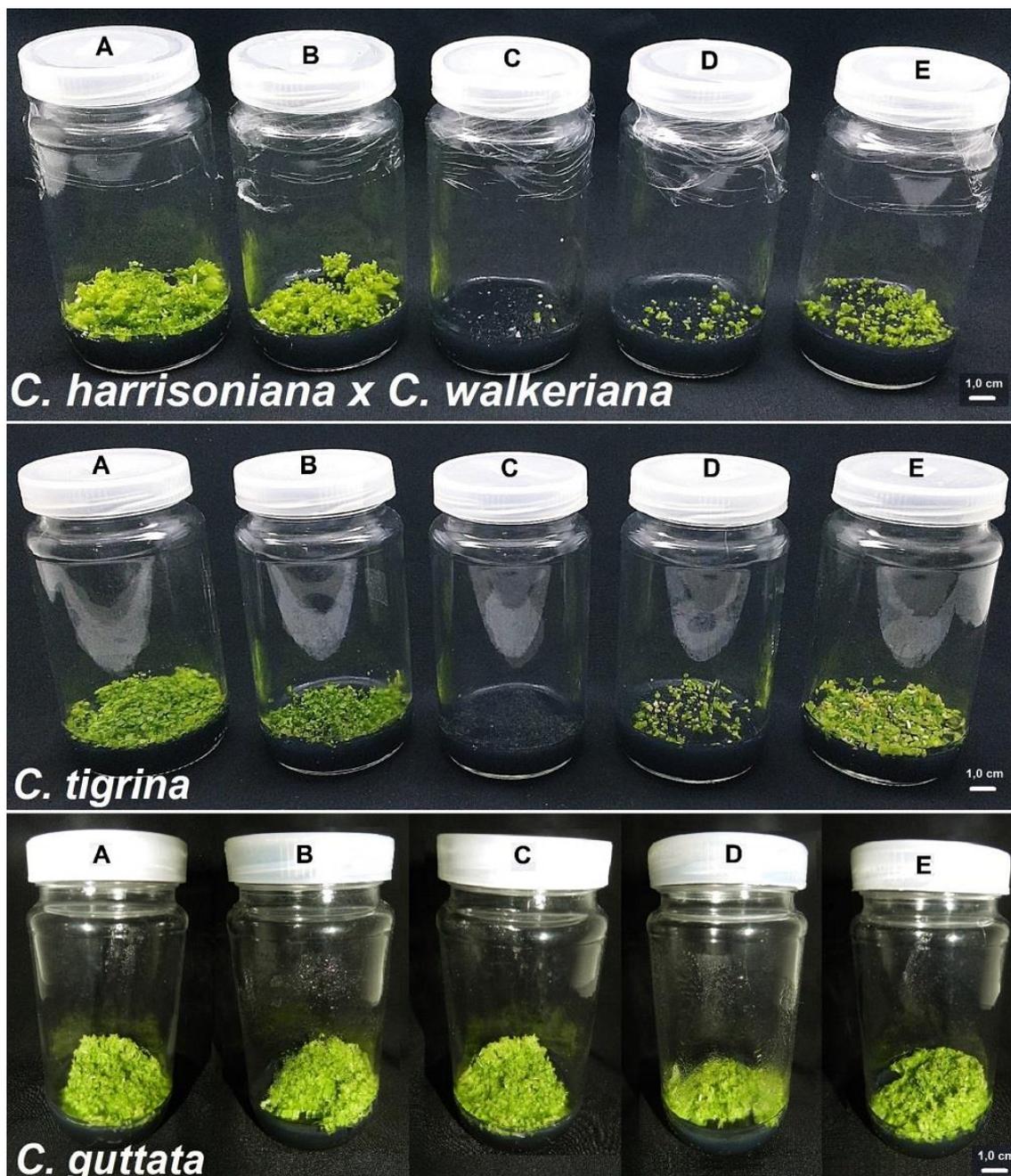
Médias na mesma coluna seguida pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ). T1 - Germinação direta (Controle 1); T2 - uma hora em PVS2 sem NL (Controle 2); T3 - 30 minutos em PVS2 + NL; T4 - uma hora em PVS2 + NL; T5 - Imersão direta em NL sem PVS2.

Para o híbrido de *C. harrisoniana* x *C. walkeriana*, o maior percentual de germinação foi observado no tratamento de uma hora em PVS2 sem NL (controle 2) (80,52%), seguido pelo tratamento de germinação direta (controle 1) (77,24%) e uma hora em PVS2 antes da imersão em NL (T4) (Figura 16) (21,43%), evidenciando que a exposição ao PVS2 não foi prejudicial à germinação das sementes do híbrido. A imersão direta das sementes em NL sem o PVS2 (T5) (0,02%) e a imersão por 30 minutos em PVS2 antes da imersão em NL (T3) (2,10%) apresentaram baixo percentual de germinação (Tabela 9), não tendo sido eficazes para a conservação das sementes deste híbrido, que apresentaram alto teor de água. A utilização do PVS2 por uma hora antes da imersão em NL foi necessária para a criopreservação das sementes imaturas deste híbrido, nas condições descritas neste trabalho. O alto teor de água das sementes (65,6%) e o efeito do tempo de exposição ao PVS2 contribuíram para estes resultados. A exposição das sementes com elevado teor de água ao PVS2 aumenta a eficiência dos protocolos para a criopreservação de sementes de orquídeas (Galdiano et al., 2013).

Para *C. tigrina*, o maior percentual de germinação foi observado no tratamento de germinação direta (controle 1) (48,78%), seguido pelo tratamento de uma hora em PVS2 sem NL (controle 2) (23,03%) e uma hora em PVS2 antes da imersão em NL (T4) (22,76%) (Figura 16). A imersão direta das sementes em

NL sem o PVS2 (T5) (0,01%) e a imersão por 30 minutos em PVS2 antes da imersão em NL (T3) apresentaram baixo percentual de germinação (2,12%) (Tabela 9), não sendo eficazes para a conservação das sementes imaturas desta espécie, que apresentaram alto teor de água. A utilização do PVS2 por uma hora antes da imersão em NL (T4) foi fundamental para aumentar a taxa de germinação das sementes imaturas criopreservadas de *C. tigrina*, nas condições descritas neste trabalho. Possivelmente, a utilização de solução vitrificante (PVS2) por uma hora tenha reduzido o conteúdo de água livre das sementes, evitando a formação de maior número de cristais de gelo ao serem imersas em NL e, conseqüentemente, aumentado a taxa de germinação. A desidratação dos tecidos causada pela exposição ao PVS2 é um passo essencial na criopreservação. Isso é importante para a recuperação e sobrevivência dos tecidos, pois a desidratação induzida pelo PVS2 permite a redução do conteúdo de água nas células evitando os danos físicos causados por cristais de gelo durante o congelamento (Sakai et al., 1991).

Para *C. guttata*, os maiores percentuais de germinação foram observados nos tratamentos de germinação direta (controle 1) (87,80%), uma hora em PVS2 sem NL (controle 2) (81,20%), uma hora em PVS2 antes da imersão em NL (T4) (78,00%) e imersão direta em NL sem PVS2 (T5) (78,80%). O tratamento de 30 minutos em PVS2 antes da imersão em NL (T3) apresentou menor percentual de germinação (Tabela 9) (59,30%). O alto percentual de germinação no tratamento de uma hora em PVS2 sem NL (T2) evidencia que a exposição ao PVS2 não foi prejudicial à germinação das sementes. Porém, a utilização do PVS2 antes da imersão em NL não foi necessária para sementes de *C. guttata* nas condições descritas neste trabalho, pois a imersão direta das sementes em NL sem o PVS2 (T5) foi eficaz para a conservação de *C. guttata*, apresentando alta taxa de germinação (78,80%) (Figura 16). O baixo teor de água das sementes (6,15%) contribuiu para esses resultados.



**Figura 16.** Aspecto morfológico dos protocormos do híbrido de *C. harrisoniana* x *C. walkeriana*, *C. tigrina* e *C. guttata* aos 90 dias após a criopreservação das sementes. (A) Controle 1 - Germinação direta das sementes *in vitro*; (B) Controle 2 - Imersão em PVS2 durante uma hora em banho de gelo; (C) Imersão direta das sementes em NL; (D) Imersão em PVS2 durante 30 minutos em banho de gelo antes da imersão em NL; (E) Imersão em PVS2 durante uma hora em banho de gelo antes da imersão em NL. Barras = 1,0 cm. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.

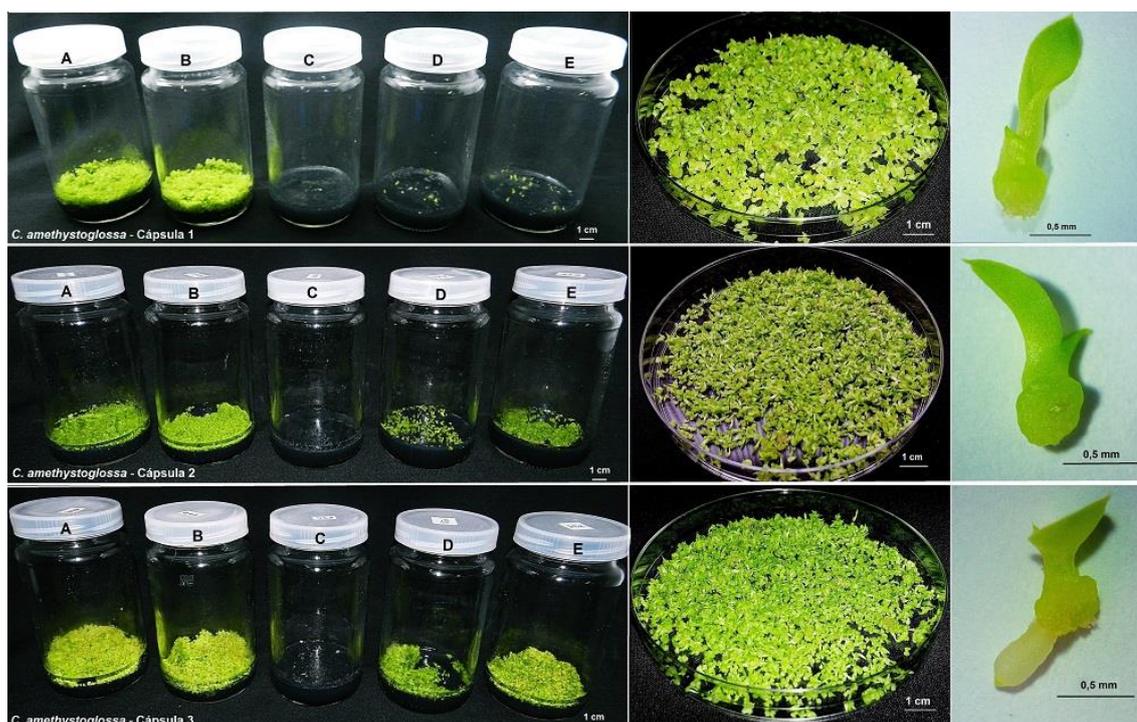
Para os três lotes de sementes de *C. amethystoglossa* (cápsulas 1, 2 e 3), os maiores percentuais de germinação foram observados nos tratamentos de

germinação direta (controle 1) (74,4%, 42,2% e 88,2 %) e uma hora em PVS2 sem NL (controle 2) (80,2%, 44,7% e 93,8%), seguidos pelo tratamento de uma hora em PVS2 antes da imersão em NL (T4) (0,2%, 15,0% e 60,8%), evidenciando que a exposição ao PVS2 não foi prejudicial à germinação das sementes. A imersão direta das sementes em NL sem o PVS2 (T5) (0,0%, 0,1% e 0,0%) e a imersão por 30 minutos em PVS2 antes da imersão em NL (T3) (0,1%, 3,6% e 29,6%) apresentaram baixo ou nenhum percentual de germinação (Tabela 10), não tendo sido eficazes para a conservação das sementes imaturas desta espécie, que apresentaram alto teor de água. A utilização do PVS2 por uma hora antes da imersão em NL (T4) foi fundamental para aumentar a taxa de germinação das sementes imaturas criopreservadas de *C. amethystoglossa* nos três lotes de sementes, nas condições descritas neste trabalho. O alto teor de água das sementes (67,9%, 49,4% e 33,0%) e o efeito do tempo de exposição ao PVS2 na desidratação das sementes contribuíram para estes resultados.

**Tabela 10.** Germinação das sementes de *C. amethystoglossa* criopreservadas, 90 dias após a semeadura. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.

Tratamento	Sementes Germinadas (%)		
	<i>C. amethystoglossa</i> (Cápsula 1)	<i>C. amethystoglossa</i> (Cápsula 2)	<i>C. amethystoglossa</i> (Cápsula 3)
T1	74,4 a	42,2 a	88,2 a
T2	80,2 a	44,7 a	93,8 a
T3	0,1 b	3,6 c	29,6 c
T4	0,2 b	15,0 b	60,8 b
T5	0,0 b	0,1 c	0,0 d
<b>CV (%)</b>	26,6	13,0	9,5

Médias na mesma coluna seguida pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ). T1 - Germinação direta (Controle 1); T2 - uma hora em PVS2 sem NL (Controle 2); T3 - 30 minutos em PVS2 + NL; T4 - uma hora em PVS2 + NL; T5 - Imersão direta em NL sem PVS2.



**Figura 17.** Aspecto morfológico dos protocormos de *C. amethystoglossa* aos 90 dias após a criopreservação das sementes. (A) Controle 1 - Germinação direta das sementes *in vitro*; (B) Controle 2 - Imersão em PVS2 durante uma hora em banho de gelo; (C) Imersão direta das sementes em NL; (D) Imersão em PVS2 durante 30 minutos em banho de gelo antes da imersão em NL; (E) Imersão em PVS2 durante uma hora em banho de gelo antes da imersão em NL. Barra = 1 cm. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.

Para a cápsula de *C. loddigesii*, que apresentava umidade inicial de 55,9% (cápsula 1), os maiores percentuais de germinação foram observados nos tratamentos de germinação direta (controle 1) (69,6%) e uma hora em PVS2 sem NL (controle 2) (71,3%), seguidos pelo tratamento de uma hora em PVS2 antes da imersão em NL (T4) (46,2%) (Tabela 11). De forma semelhante, para a cápsula de *C. loddigesii*, que apresentava umidade inicial de 23,8% (cápsula 2), os maiores percentuais de germinação foram observados nos tratamentos de germinação direta (controle 1) (88,0%) e uma hora em PVS2 sem NL (controle 2) (92,0%), não diferindo do tratamento de uma hora em PVS2 antes da imersão em NL (T4) (92,5%) (Tabela 11). Estes resultados evidenciam que a exposição ao PVS2 não foi prejudicial à germinação das sementes de *C. loddigesii*.

Para os dois lotes de sementes de *C. loddigesii*, a imersão por 30 minutos em PVS2 antes da imersão em NL (T3) apresentou baixo percentual de germinação (25,9% e 62,2%), enquanto a imersão direta das sementes em NL sem o PVS2 (T5) apresentou baixo ou nenhum percentual de germinação (0,0% e

0,7%) (Tabela 11), não tendo sido eficazes para a conservação das sementes imaturas desta espécie, que apresentaram alto teor de água. A utilização do PVS2 por uma hora antes da imersão em NL (T4) foi fundamental para aumentar a taxa de germinação das sementes imaturas criopreservadas de *C. Ioddigesii*, nas condições descritas neste trabalho. O alto teor de água das sementes (55,9% e 23,8%) e o efeito do tempo de exposição ao PVS2 contribuíram para estes resultados.

**Tabela 11.** Germinação das sementes de *C. Ioddigesii* criopreservadas, 90 dias após a sementeira. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.

Tratamento	Sementes Germinadas (%)	
	<i>C. Ioddigesii</i> (Cápsula 1)	<i>C. Ioddigesii</i> (Cápsula 2)
T1	69,6 a	88,0 a
T2	71,3 a	92,0 a
T3	25,9 c	62,2 b
T4	46,2 b	92,5 a
T5	0,0 d	0,7 c
<b>CV (%)</b>	10,7	5,2

Médias na mesma coluna seguida pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ). T1 - Germinação direta (Controle 1); T2 - uma hora em PVS2 sem NL (Controle 2); T3 - 30 minutos em PVS2 + NL; T4 - uma hora em PVS2 + NL; T5 - Imersão direta em NL sem PVS2.



**Figura 18.** Aspecto morfológico dos protocormos de *C. Ioddigesii* aos 90 dias após a criopreservação das sementes. (A) Controle 1 - Germinação direta das sementes *in vitro*; (B) Controle 2 - Imersão em PVS2 durante uma hora em banho de gelo; (C) Imersão direta das sementes em NL; (D) Imersão em PVS2 durante 30 minutos em banho de gelo antes da imersão em NL; (E) Imersão em PVS2 durante uma hora em banho de gelo antes da imersão em NL. Barra = 1 cm. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.

Estes dados sugerem que a resposta das sementes aos diferentes tratamentos de criopreservação seja dependente do teor de água inicial, que pode estar relacionada ao tempo de maturação. O tempo de maturação das sementes também parece ser fator preponderante para sua sobrevivência e germinação após a criopreservação, uma vez que sementes maduras têm menor teor de água que sementes imaturas, minimizando a formação de gelo intracelular (Galdiano et al., 2017).

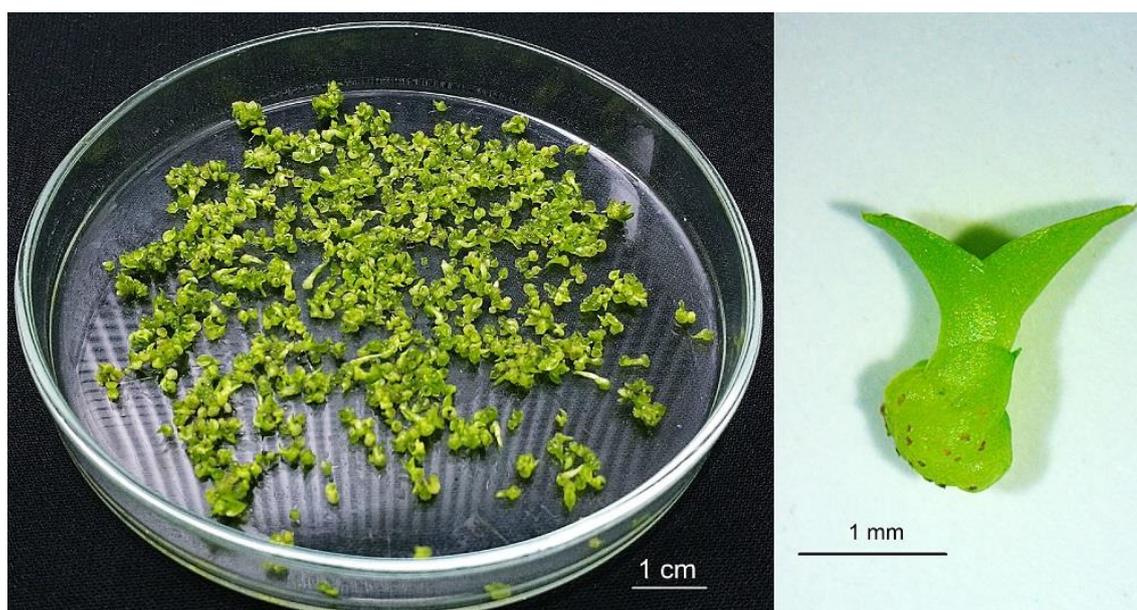
O baixo teor de água dos tecidos é importante para o sucesso da criopreservação (Benson, 2008; Engelmann, 2011). Neste trabalho, para as sementes imaturas do híbrido de *C. harrisoniana* x *C. walkeriana*, *C. tigrina*, *C. amethystoglossa* e *C. loddigesii* com alto teor de água, o sucesso da criopreservação só foi possível após a vitrificação. No entanto, para as sementes maduras de *C. guttata*, que já apresentavam baixo teor de água, a utilização do PVS2 antes da imersão em NL não foi necessária.

Galdiano et al. (2017) foram os primeiros a criopreservarem sementes de orquídeas do gênero *Cattleya*. As sementes de *C. walkeriana*, uma espécie ameaçada de extinção, com 16% de teor de água, apresentaram 53% de germinação após a desidratação em PVS2 por uma hora (Galdiano et al., 2017). Esses dados estão em consonância com os dados do presente trabalho, em que o melhor tempo de exposição ao PVS2 para o híbrido de *C. harrisoniana* x *C. walkeriana* e para *C. tigrina*, *C. amethystoglossa* e *C. loddigesii* foi de uma hora antes da imersão em NL, quando comparado com o tempo de imersão em PVS2 por 30 minutos.

Tendo em vista que as espécies deste trabalho correm risco de extinção, estes resultados de germinação são considerados satisfatórios para as quatro espécies e o híbrido, pois uma única cápsula tem um enorme número de sementes, sendo possível a conservação de milhares de plantas-irmãs. Por exemplo, a cápsula da *C. tigrina* utilizada no experimento continha, aproximadamente, 1.610.000 sementes; já a cápsula do híbrido de *C. harrisoniana* x *C. walkeriana* continha, aproximadamente, 2.664.000 sementes. Portanto, os percentuais de germinação de 22,76% e 21,43% observados no tratamento de uma hora em PVS2 antes da imersão em NL na *C. tigrina* e no híbrido de *C. harrisoniana* x *C. walkeriana* correspondem a, aproximadamente,

366 mil e 570 mil plantas-irmãs por cápsula, respectivamente (dados não mostrados).

Aos 90 dias após a criopreservação das sementes, os protocormos de todos os tratamentos apresentaram morfologia semelhante, com presença de rizoides na porção basal e formação de primórdios foliares na porção apical, (Figuras 17, 18 e 19), para as quatro espécies e o híbrido.



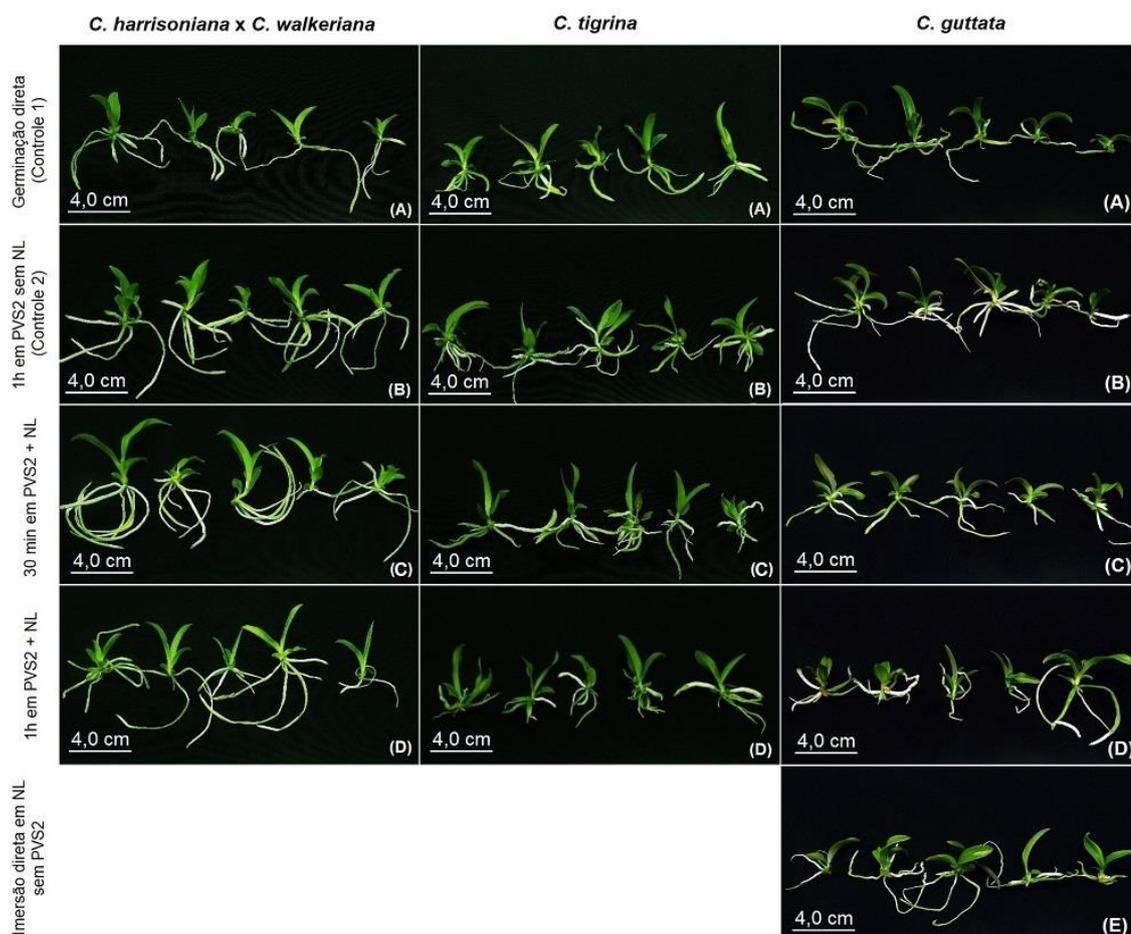
**Figura 19.** Aspecto morfológico dos protocormos de *C. guttata* aos 90 dias após a criopreservação das sementes, do tratamento de imersão direta das sementes em NL. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.

### 5.1.2. Crescimento *in vitro* das plântulas

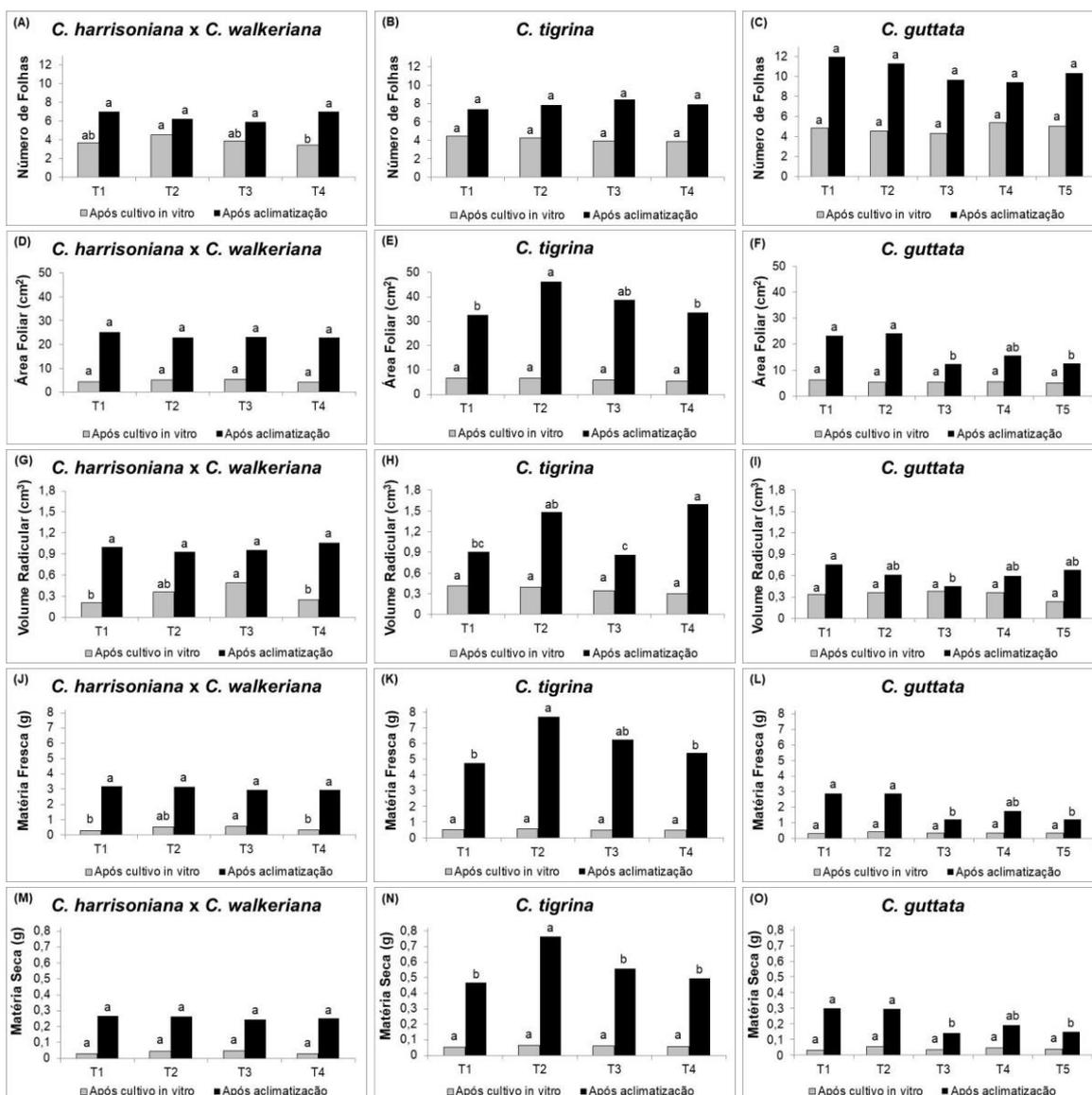
#### 5.1.2.1. Análises biométricas

Após um ano *in vitro*, as sementes germinadas das quatro espécies e do híbrido desenvolveram plantas normais (Figuras 20, 22 e 24). O híbrido *C. harrisoniana* x *C. walkeriana* não apresentou diferença para as variáveis de área foliar (Figura 21 - D) e massa da matéria seca (Figura 21 - M). Para as variáveis de número de folhas (Figura 21 - A), volume radicular (Figura 21 - G) e massa da matéria fresca (Figura 21 - J), o tratamento de uma hora em PVS2, seguido pela imersão em NL (T4), apresentou menores valores, porém não diferiu do

tratamento de germinação direta (controle 1). As plantas de *C. tigrina* e *C. guttata* de todos os tratamentos não apresentaram diferenças para variáveis biométricas como número de folhas (Figura 21 - B e C), área foliar (Figura 21 - E e F), volume radicular (Figura 21 - H e I), massa da matéria fresca (Figura 21 - K e L) e massa da matéria seca (Figura 21 - N e O).



**Figura 20.** Aspecto morfológico das plantas do híbrido de *C. harrisoniana* x *C. walkeriana*, *C. tigrina* e *C. guttata* provenientes de sementes criopreservadas após um ano de cultivo *in vitro*. (A) Germinação direta (Controle 1); (B) uma hora em PVS2 sem NL (Controle 2); (C) 30 minutos em PVS2 + NL ; (D) uma hora em PVS2 + NL e (E) Imersão direta em NL sem PVS2. Barras = 4,0 cm. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.



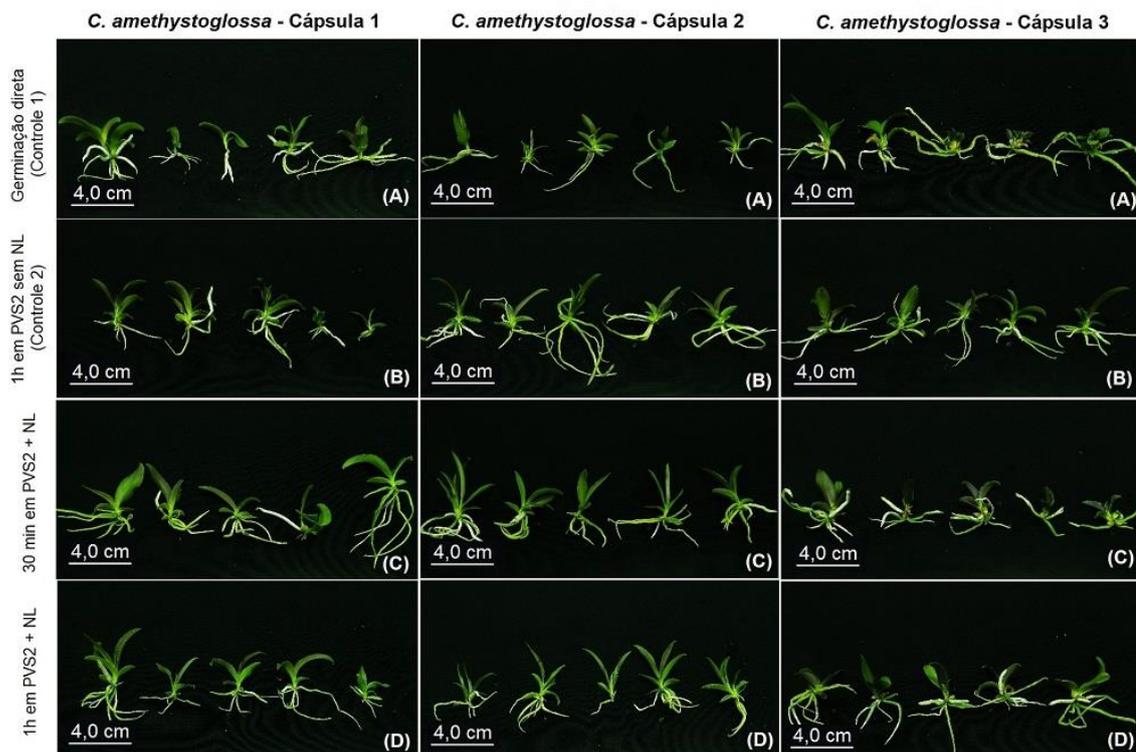
**Figura 21.** Número de folhas (A, B e C), área foliar (D, E e F), volume radicular (G, H e I), massa da matéria fresca (J, K e L) e massa da matéria seca (M, N e O) de plantas do híbrido de *C. harrisoniana x C. walkeriana*, *C. tigrina* e *C. guttata* provenientes de sementes criopreservadas após um ano de cultivo *in vitro* e após seis meses de aclimatização em casa de vegetação. T1 - Germinação direta (Controle 1); T2 - uma hora em PVS2 sem NL (Controle 2); T3 - 30 minutos em PVS2 + NL; T4 - uma hora em PVS2 + NL; T5 - Imersão direta em NL sem PVS2. Letras comparam os tratamentos dentro de cada tempo para cada espécie e diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.

Após um ano de cultivo *in vitro*, as plantas de *C. amethystoglossa*, em todos os tratamentos, oriundas do primeiro lote de sementes (cápsula 1), com umidade inicial de 67,9%, não apresentaram diferenças para as variáveis número de folhas (Figura 23 - A), área foliar (Figura 23 - D), volume radicular (Figura 23 -

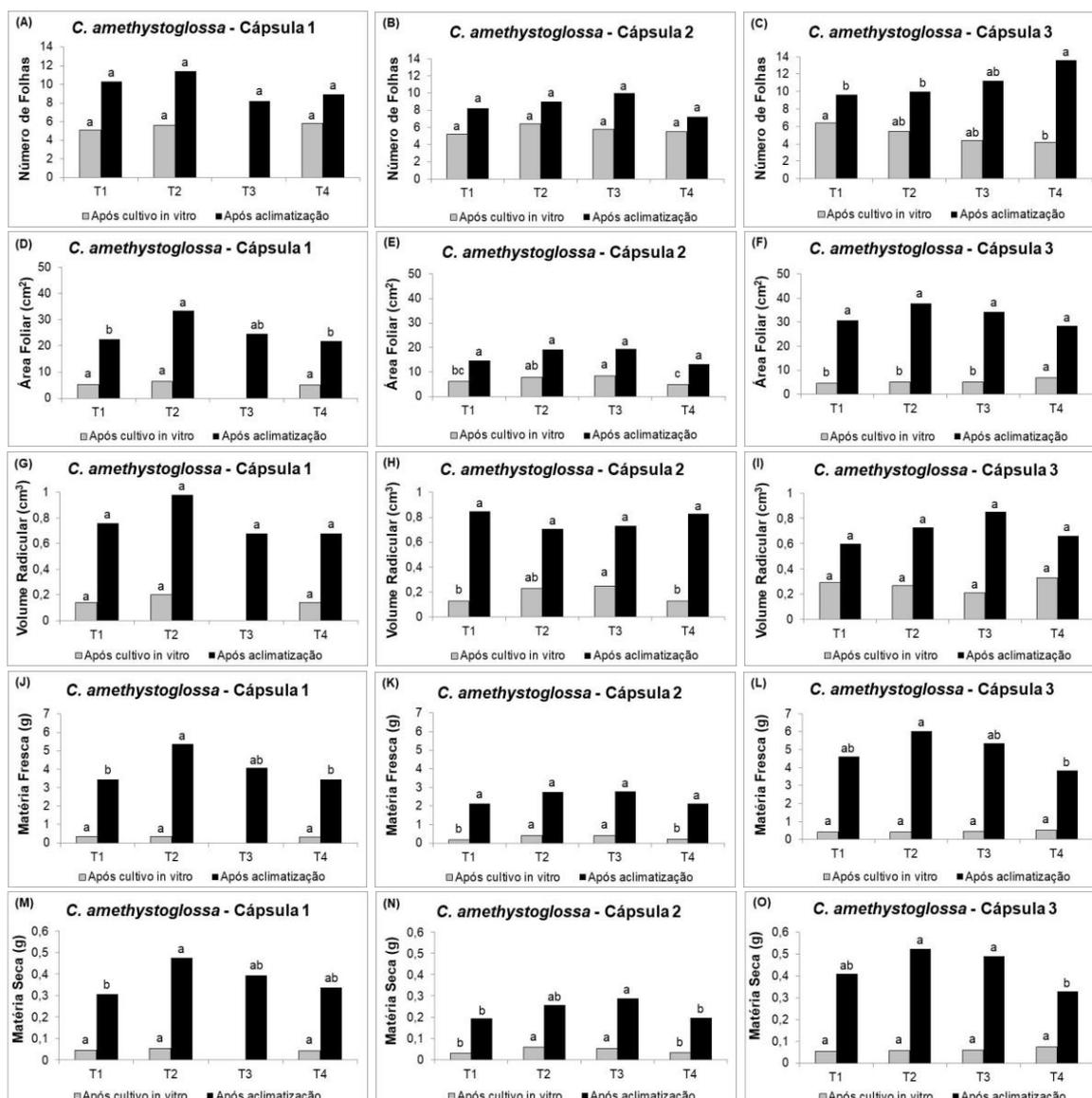
G), massa da matéria fresca (Figura 23 - J) e massa da matéria seca (Figura 23 - M). Vale ressaltar que as plantas de *C. amethystoglossa* deste lote de sementes (cápsula 1), oriundas do tratamento de imersão por 30 minutos em PVS2, seguido pela imersão em NL (T3), por apresentarem baixo percentual de germinação, seguiram direto para a fase de aclimatização, não tendo sido feitas análises biométricas e fisiológicas nesta etapa do experimento.

Para o segundo lote de sementes de *C. amethystoglossa* (cápsula 2), com umidade inicial de 49,4%, as plantas após um ano de cultivo *in vitro* para todos os tratamentos não apresentaram diferenças para número de folhas (Figura 23 - B). Para as variáveis de área foliar (Figura 23 - E), volume radicular (Figura 23 - H), massa da matéria fresca (Figura 23 - K) e massa da matéria seca (Figura 23 - N), o tratamento de uma hora em PVS2, seguido pela imersão em NL (T4), apresentou menores valores, porém não diferiu do tratamento de germinação direta (controle 1).

Já o terceiro lote de sementes de *C. amethystoglossa* (cápsula 3), com umidade inicial de 33,0%, as plantas após um ano de cultivo *in vitro* para todos os tratamentos não apresentaram diferenças para volume radicular (Figura 23 - I), massa da matéria fresca (Figura 23 - L) e massa da matéria seca (Figura 23 - O). Para a variável de número de folhas (Figura 23 - C), os tratamentos de 30 minutos e uma hora em PVS2, seguido pela imersão em NL (T3 e T4), apresentaram menores valores, não diferindo do tratamento de imersão por uma hora em PVS2 sem NL (controle 2). Entretanto, para a variável área foliar (Figura 23 - F), o tratamento de uma hora em PVS2, seguido pela imersão em NL (T4), apresentou valores superiores aos demais tratamentos.



**Figura 22.** Aspecto morfológico das plantas de *C. amethystoglossa* provenientes de sementes criopreservadas após um ano de cultivo *in vitro*. (A) Germinação direta (Controle 1); (B) uma hora em PVS2 sem NL (Controle 2); (C) 30 minutos em PVS2 + NL e (D) uma hora em PVS2 + NL. Barras = 4,0 cm. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.

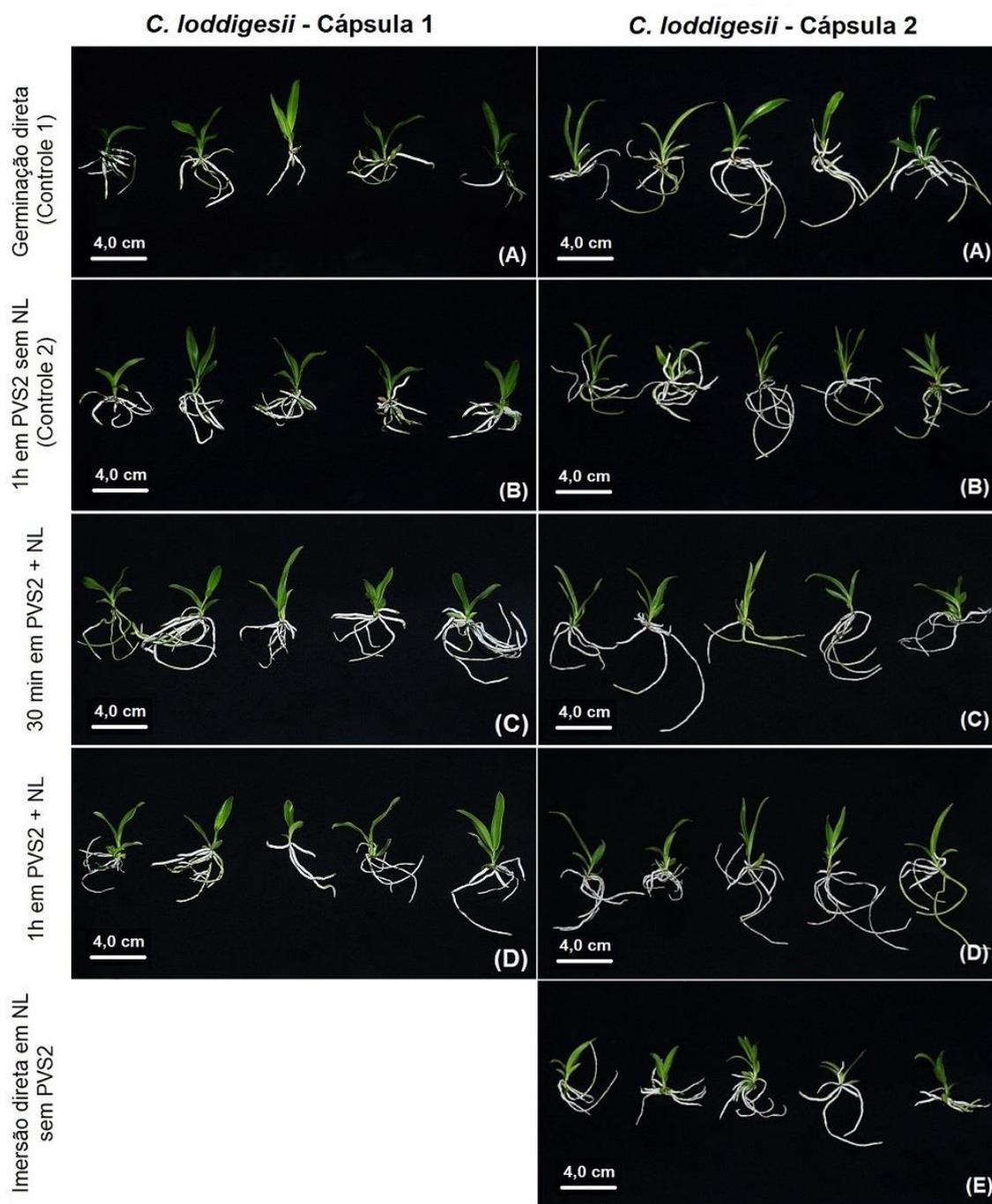


**Figura 23.** Número de folhas (A, B e C), área foliar (D, E e F), volume radicular (G, H e I), massa da matéria fresca (J, K e L) e massa da matéria seca (M, N e O) de plantas de *C. amethystoglossa* provenientes de sementes criopreservadas após um ano de cultivo *in vitro* e após seis meses de aclimatização em casa de vegetação. T1 - Germinação direta (Controle 1); T2 - uma hora em PVS2 sem NL (Controle 2); T3 - 30 minutos em PVS2 + NL; T4 - uma hora em PVS2 + NL. Letras comparam os tratamentos dentro de cada tempo para cada espécie e diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.

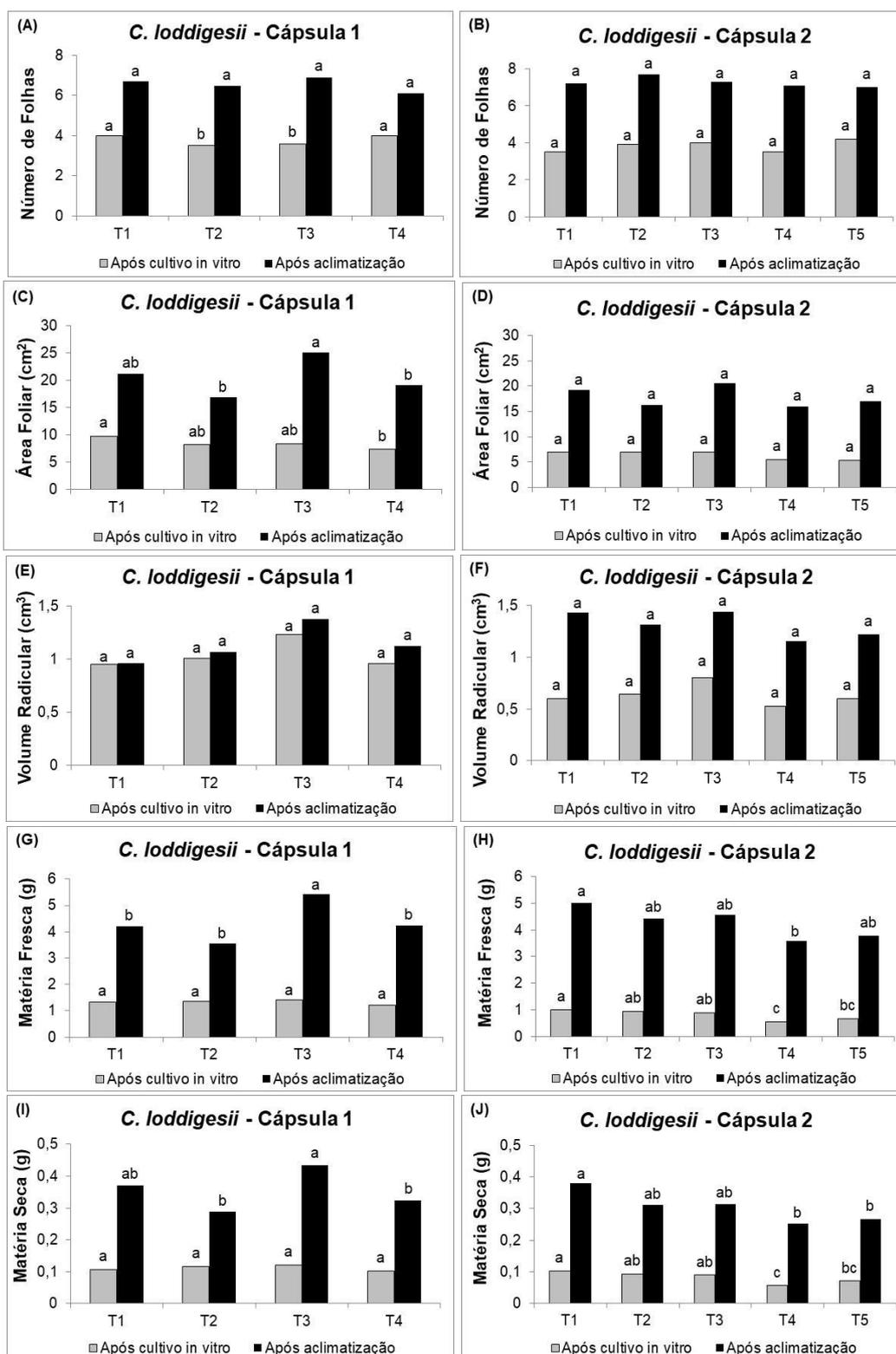
Após um ano de cultivo *in vitro*, as plantas de todos os tratamentos de *C. loddigesii*, oriundas do primeiro lote de sementes (cápsula 1), com umidade inicial de 55,9%, não apresentaram diferenças para as variáveis volume radicular (Figura 25 - E), massa da matéria fresca (Figura 25 - G) e massa da matéria seca

(Figura 25 - I). Para a variável de área foliar (Figura 25 - C), o tratamento de uma hora em PVS2, seguido pela imersão em NL (T4), apresentou menores valores em relação à germinação direta das sementes (controle 1), não diferindo do tratamento de imersão por uma hora em PVS2 sem NL (controle 2) e do tratamento de 30 minutos em PVS2, seguido pela imersão em NL (T3). Entretanto para a variável número de folhas (Figura 25 - A), o tratamento de uma hora em PVS2, seguido pela imersão em NL (T4), apresentou valores superiores aos demais tratamentos, não diferindo da germinação direta das sementes (controle 1).

Para o segundo lote de sementes de *C. loddigesii* (cápsula 2), com umidade inicial de 23,8%, as plantas, após um ano de cultivo *in vitro* para todos os tratamentos, não apresentaram diferenças para número de folhas (Figura 25 - B), área foliar (Figura 25 - D) e volume radicular (Figura 25 - F). Para as variáveis massa da matéria fresca (Figura 25 - H) e massa da matéria seca (Figura 25 - J), o tratamento de uma hora em PVS2, seguido pela imersão em NL (T4), não diferiu da imersão direta das sementes em NL sem PVS2 (T5), ambos os tratamentos apresentando valores inferiores aos tratamentos de germinação direta (controle 1), uma hora em PVS2 sem NL (controle 2) e 30 minutos em PVS2, seguido pela imersão em NL (T3).



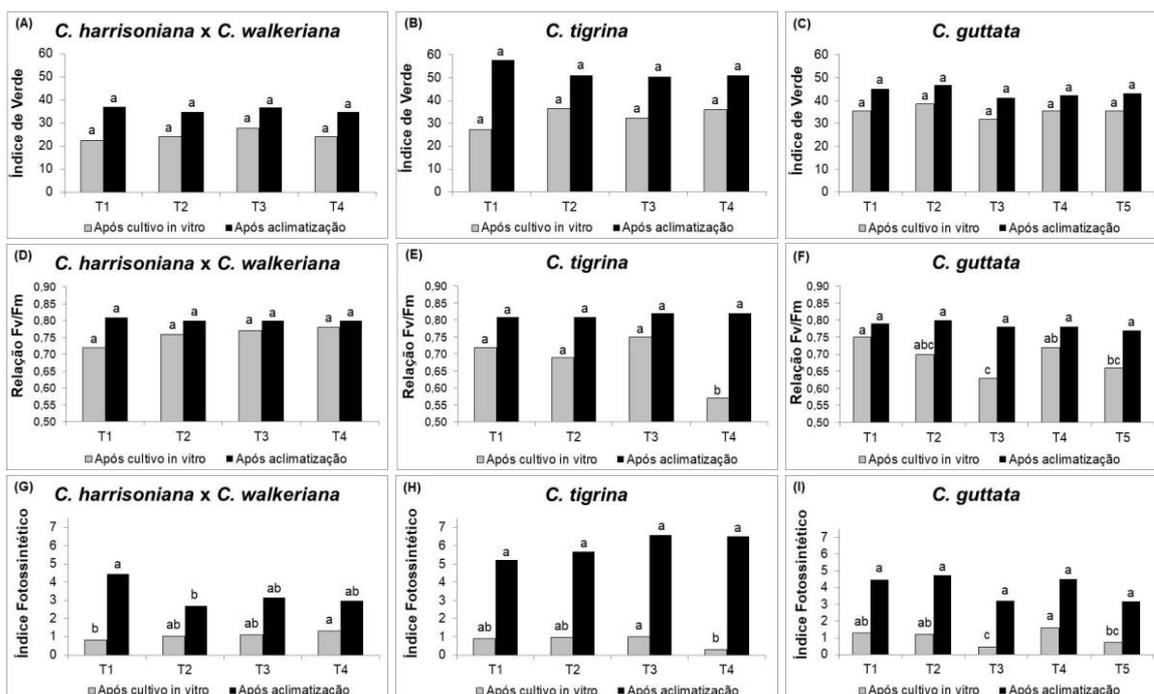
**Figura 24.** Aspecto morfológico das plantas de *C. loddigesii* provenientes de sementes criopreservadas após 12 meses de cultivo *in vitro*. (A) Germinação direta (Controle 1); (B) uma hora em PVS2 sem NL (Controle 2); (C) 30 minutos em PVS2 + NL; (D) uma hora em PVS2 + NL e (E) Imersão direta das sementes em NL. Barras = 4,0 cm. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.



**Figura 25.** Número de folhas (A e B), área foliar (C e D), volume radicular (E e F), massa da matéria fresca (G e H) e massa da matéria seca (I e J) de plantas de *C. Iodigessii* provenientes de sementes criopreservadas após um ano de cultivo *in vitro* e após seis meses de aclimatização em casa de vegetação. T1 - Germinação direta (Controle 1); T2 - uma hora em PVS2 sem NL (Controle 2); T3 - 30 minutos em PVS2 + NL; T4 - uma hora em PVS2 + NL; T5 - Imersão direta em NL sem PVS2. Letras comparam os tratamentos dentro de cada tempo para cada espécie e diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.

### 5.1.2.2. Análises fisiológicas

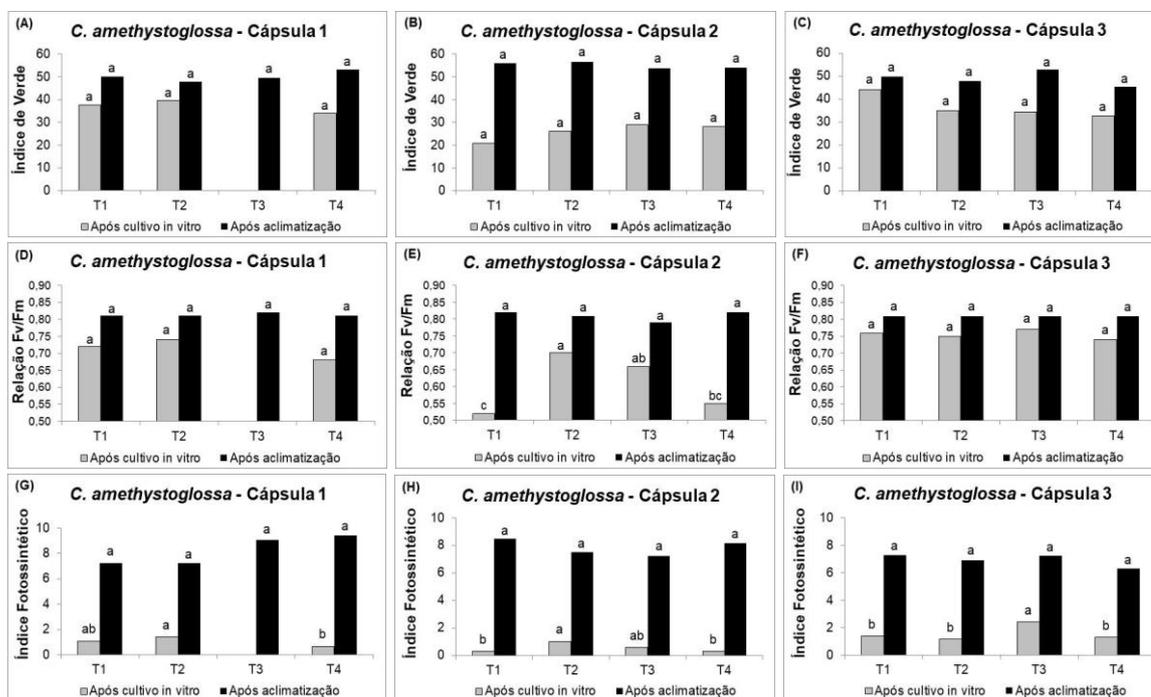
As plantas do híbrido e das espécies *C. tigrina* e *C. guttata* não apresentaram diferenças para o índice de verde após um ano de cultivo *in vitro*, independentemente do tratamento (Figura 26 - A, B e C). O híbrido apresentou valores mais uniformes de  $F_v/F_m$ , sendo inferior a 0,75 apenas no tratamento de germinação direta (0,72) (controle 1) (Figura 26 - D). Para *C. tigrina*, também se observa estresse nas plantas, mais acentuado no tratamento de uma hora em PVS2 antes da imersão em NL (T4) (0,57) (Figura 26 - E). A variável  $F_v/F_m$  para todos os tratamentos em *C. guttata* apresentou valores abaixo de 0,75 (Figura 26 - F), exceto o tratamento de germinação direta (controle 1), o que mostra as plantas terem apresentado algum tipo de estresse pela exposição das sementes ao PVS2 e ou à baixa temperatura do NL. De acordo com Bolhàr-Nordenkampf et al. (1989), a relação  $F_v/F_m$  pode variar entre 0,75 e 0,85 em plantas não submetidas a estresse. A relação  $F_v/F_m$  é usada como indicador de estresse, quando fatores bióticos ou abióticos alteram a funcionalidade do fotossistema II (FSII).



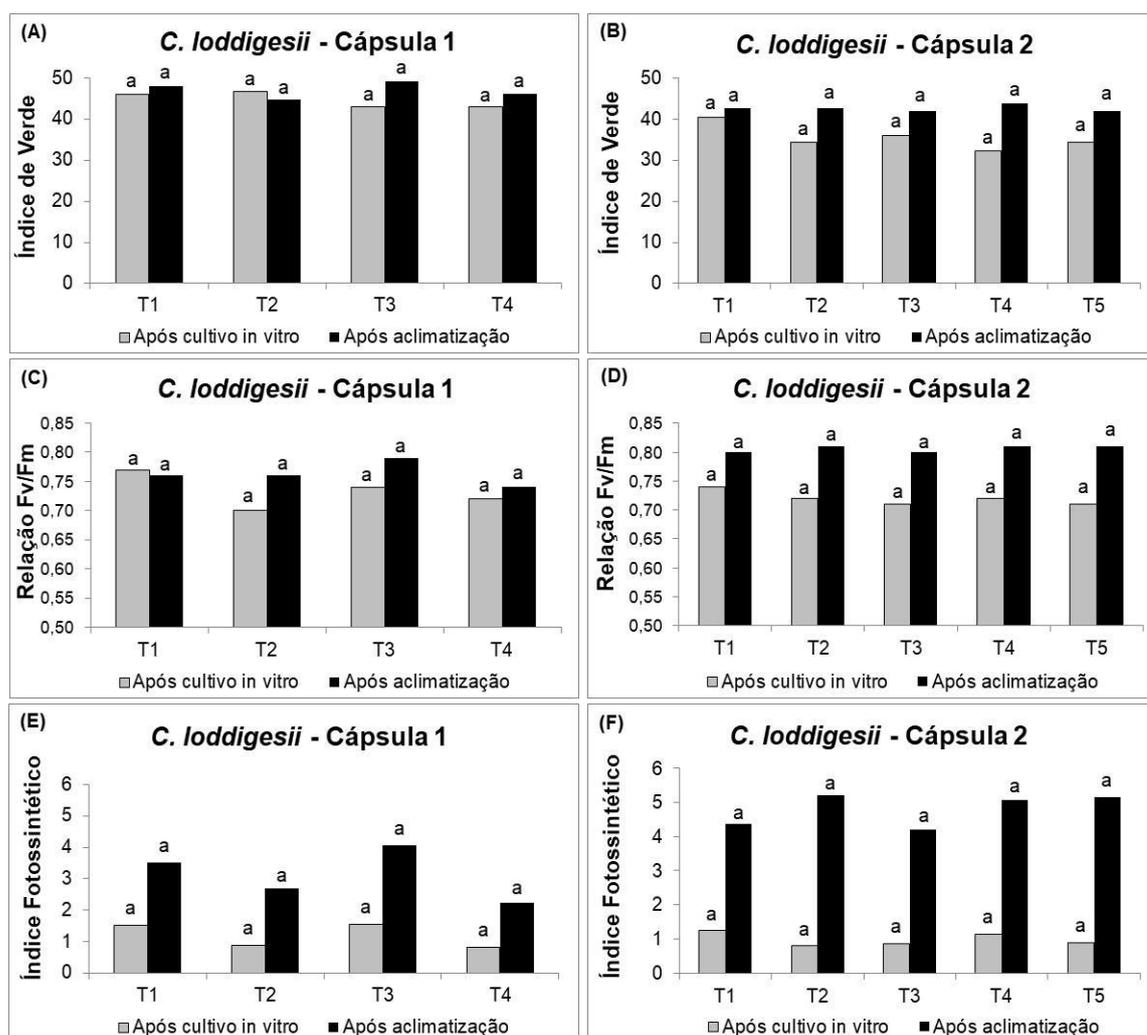
**Figura 26.** Índice de verde (A, B e C), relação  $F_v/F_m$  (D, E e F) e índice fotossintético (PI) (G, H e I) de plantas do híbrido de *C. harrisoniana* x *C. walkeriana*, *C. tigrina* e *C. guttata* provenientes de sementes criopreservadas após um ano de cultivo *in vitro* e após seis meses de aclimatização em casa de vegetação. T1 - Germinação direta (Controle 1); T2 - uma hora em PVS2 sem NL (Controle 2); T3 - 30 minutos em PVS2 + NL; T4 - uma hora em PVS2 + NL; T5 - Imersão direta em NL sem PVS2. Letras comparam os tratamentos dentro de cada tempo para cada espécie e diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.

As plantas de *C. amethystoglossa* e *C. loddigesii* não apresentaram diferença para índice de verde após um ano de cultivo *in vitro*, independentemente do tratamento ou da umidade inicial das sementes (Figura 27 - A, B e C; Figura 28 - A e B), com valores variando entre 20,7 e 44,2 para *C. amethystoglossa* e entre 32,1 e 46,7 para *C. loddigesii*. Para *C. Amethystoglossa*, os valores de  $F_v/F_m$  foram mais uniformes nas plantas oriundas de sementes com umidade inicial de 67,9% (cápsula 1) (Figura 27 - D) e 33,0% (cápsula 3) (Figura 27 - F). Enquanto nas plantas oriundas de sementes com umidade inicial de 49,4% (cápsula 2), observa-se estresse, com valores de  $F_v/F_m$  inferiores a 0,75, independentemente do tratamento (Figura 27 - E), mostrando que o estresse apresentado não está relacionado à tolerância à exposição em PVS2 e ao NL. Já as plantas de *C. loddigesii* não apresentaram diferença para os valores de  $F_v/F_m$

após um ano de cultivo *in vitro*, independentemente do tratamento ou da umidade inicial das sementes (Figura 28 - C e D), com valores variando de 0,70 a 0,77.



**Figura 27.** Índice de verde (A, B e C), relação  $F_v/F_m$  (D, E e F) e índice fotossintético (PI) (G, H e I) de plantas de *C. amethystoglossa* provenientes de sementes criopreservadas após um ano de cultivo *in vitro* e após seis meses de aclimatização em casa de vegetação. T1 - Germinação direta (Controle 1); T2 - uma hora em PVS2 sem NL (Controle 2); T3 - 30 minutos em PVS2 + NL; T4 - uma hora em PVS2 + NL. Letras comparam os tratamentos dentro de cada tempo para cada espécie e diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.



**Figura 28.** Índice de verde (A e B), relação  $F_v/F_m$  (C e D) e índice fotossintético (PI) (E e F) de plantas de *C. loddigesii* provenientes de sementes criopreservadas após um ano de cultivo *in vitro* e após seis meses de aclimatização em casa de vegetação. T1 - Germinação direta (Controle 1); T2 - uma hora em PVS2 sem NL (Controle 2); T3 - 30 minutos em PVS2 + NL; T4 - uma hora em PVS2 + NL; T5 - Imersão direta em NL sem PVS2. Letras comparam os tratamentos dentro de cada tempo para cada espécie e diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.

Huylenbroeck et al. (1998) citam que, em condições de cultivo *in vitro*, ocorre baixa atividade da regulação da Rubisco, em razão da fonte externa de carbono (C) no meio, sugerindo a possibilidade de inibição da fotossíntese. A relação  $F_v/F_m$  reduzida apresentada em alguns tratamentos deste trabalho não foi drástica, não tendo sido observados sintomas visuais de fotoinibição, como clorose, senescência foliar ou morte das plantas *in vitro*. Casos extremos de

fotoinibição são considerados quando o valor de  $F_v/F_m$  se aproxima de zero (Björkman e Demming, 1987).

Para o híbrido *C. harrisoniana* x *C. walkeriana*, os tempos de 30 minutos (T3) e uma hora em PVS2 antes da imersão em NL (T4) apresentaram PI superior ao tratamento de germinação direta (controle 1), mostrando tolerância à exposição em PVS2 e ao NL (Figura 26 - G). Para *C. tigrina* e *C. guttata*, a variável PI correspondeu diretamente à variável  $F_v/F_m$  em todos os tratamentos (Figura 26 - H e I). O PI na maioria dos estresses abióticos tem sido considerado uma variável mais sensível que a relação  $F_v/F_m$ . Enquanto a relação  $F_v/F_m$  reflete a máxima capacidade fotoquímica e se relaciona com o número de complexos ativos no FSII, o PI mostra a atividade dos fotossistemas I e II, servindo para detectar, de forma mais refinada, alterações no desempenho da planta sob condição de estresse que não causam modificações na relação  $F_v/F_m$  (Jiang et al., 2006; Christen et al., 2007; Stirbet e Govindje, 2011).

Para *C. amethystoglossa*, o tempo de uma hora em PVS2 antes da imersão em NL (T4) apresentou valores de PI inferiores aos demais tratamentos, independentemente da umidade inicial das sementes (Figura 27 - G, H e I), entretando esses valores não diferem dos apresentados para o tratamento de germinação direta (controle 1), mostrando que valores inferiores de PI não estão relacionados à tolerância à exposição em PVS2 e ao NL. Para *C. loddigesii*, a variável PI correspondeu diretamente à variável  $F_v/F_m$  em todos os tratamentos (Figura 28 - E e F).

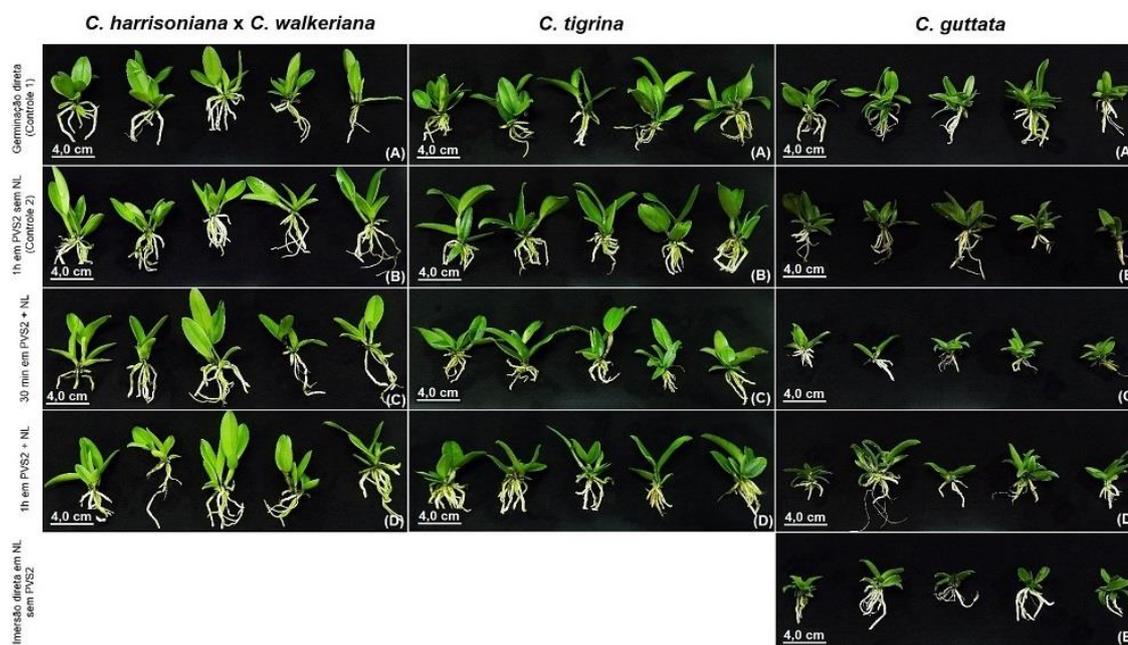
### **5.1.3. Aclimatização das plantas**

#### **5.1.3.1. Análises biométricas**

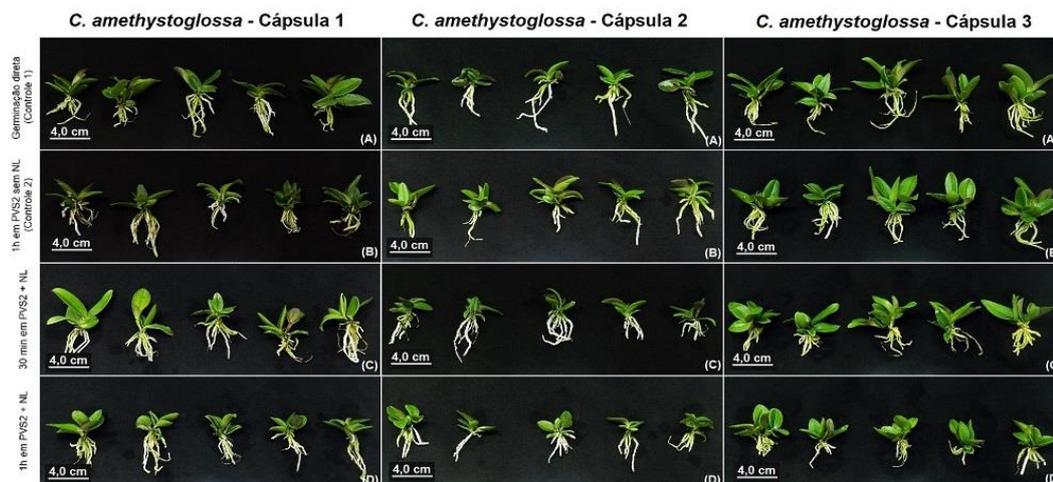
Existem poucos trabalhos mostrando com detalhes a fase de aclimatização das plântulas de orquídeas oriundas de sementes criopreservadas. Plântulas de híbridos do gênero *Dendrobium*, oriundas de sementes criopreservadas por vitrificação, foram bem aclimatizadas por Vendrame et al. (2007) em casa de vegetação, utilizando fibra de coco como substrato, desenvolvendo plantas normais, com 100% de sobrevivência. Outras espécies, entre elas o *Dendrobium* híbrido 'Dong Yai' (Galdiano et al., 2012) e *Oncidium*

*flexuosum* (Galdiano et al., 2013), também foram aclimatizadas em fibra de coco, com sucesso, após a criopreservação das sementes por vitrificação, com sobrevivência superior a 90%. Galdiano et al. (2017) utilizaram três tipos de substrato na aclimatização de plântulas de *C. walkeriana* oriundas de sementes criopreservadas por vitrificação, sendo os melhores resultados de sobrevivência obtidos pela mistura de esfagno com casca de pinus (1:1) ou pelo uso de esfagno puro. No entanto, os trabalhos acima citados não avaliaram muitas variáveis, apenas taxa de sobrevivência e análise visual das plantas, a fim de analisar, com detalhes, a fase de aclimatização após a criopreservação das sementes.

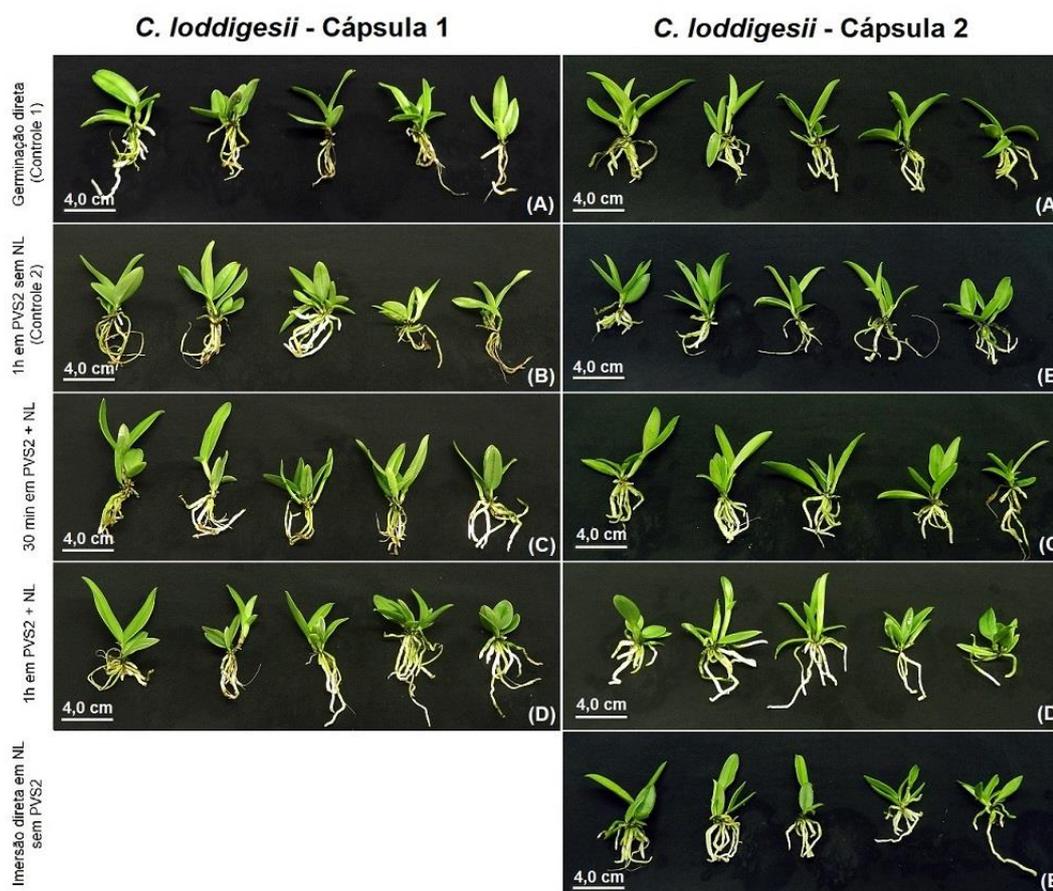
Após seis meses em condições de casa de vegetação, as plantas aclimatizadas apresentaram 100% de sobrevivência (Figuras 29, 30 e 31), com aumento em todas as variáveis biométricas. Para o híbrido de *C. harrisoniana* x *C. walkeriana*, *C. tigrina* e *C. guttata*, não foi observada diferença para número de folhas, independentemente do tratamento (Figura 21 - A, B e C).



**Figura 29.** Aspecto morfológico das plantas do híbrido de *C. harrisoniana* x *C. walkeriana*, *C. tigrina* e *C. guttata* provenientes de sementes criopreservadas após seis meses de aclimatização em casa de vegetação. (A) Germinação direta (Controle 1); (B) uma hora em PVS2 sem NL (Controle 2); (C) 30 minutos em PVS2 + NL ; (D) uma hora em PVS2 + NL e (E) Imersão direta em NL sem PVS2. Barras = 4,0 cm. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.



**Figura 30.** Aspecto morfológico das plantas de *C. amethystoglossa* provenientes de sementes criopreservadas após seis meses de aclimatização em casa de vegetação. (A) Germinação direta (Controle 1); (B) uma hora em PVS2 sem NL (Controle 2); (C) 30 minutos em PVS2 + NL e (D) uma hora em PVS2 + NL. Barras = 4,0 cm. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.



**Figura 31.** Aspecto morfológico das plantas de *C. loddigesii* provenientes de sementes criopreservadas após seis meses de aclimatização em casa de vegetação. (A) Germinação direta (Controle 1); (B) uma hora em PVS2 sem NL (Controle 2); (C) 30 minutos em PVS2 + NL; (D) uma hora em PVS2 + NL e (E) Imersão direta das sementes em NL. Barras = 4,0 cm. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.

No híbrido *C. harrisoniana* x *C. walkeriana*, as plantas de todos os tratamentos não apresentaram diferenças para as variáveis biométricas área foliar, volume radicular, massa da matéria fresca e massa da matéria seca após a aclimatização (Figura 21 - D, G, J e M).

Para *C. tigrina*, o tratamento de uma hora em PVS2, seguido pela imersão em NL (T4), apresentou maior volume radicular, não diferindo significativamente do controle 2 (Figura 21 - H). Este tratamento (T4) apresentou menor área foliar, não diferindo do controle 1, menor matéria fresca e menor matéria seca, não diferindo do controle 1 e de T3 (Figura 21 - E, K e N), após a aclimatização.

Para *C. guttata*, a área foliar, a matéria fresca e a matéria seca após a aclimatização foram menores no tratamento de 30 minutos em PVS2 antes da imersão em NL (T3) e no tratamento de imersão direta das sementes em NL (T5) (Figura 21 - J, L e O). Segundo Mayer et al. (2008), as raízes de orquídeas provenientes do cultivo *in vitro* nem sempre são eficientes na absorção de água e de nutrientes após a transferência para o ambiente *ex vitro*. Em razão da estrutura anatômica delicada, elas podem cessar seu crescimento ou até morrer, com isso, novas raízes funcionais são emitidas durante a aclimatização. As plantas do tratamento de 30 minutos em PVS2 antes da imersão em NL (T3), para *C. guttata*, também apresentaram menor volume radicular, em comparação com o tratamento de germinação direta (controle 1) (Figura 21 - I).

Após seis meses de aclimatização em casa de vegetação, não foi observada diferença para volume radicular nas plantas dos três lotes de sementes de *C. amethystoglossa*, independentemente do tratamento (Figura 23 - G, H e I). As plantas de todos os tratamentos de *C. amethystoglossa*, oriundas do primeiro lote de sementes (cápsula 1) com umidade inicial de 67,9%, não apresentaram diferença para a variável número de folhas (Figura 23 - A). Para as variáveis área foliar (Figura 23 - D), massa da matéria fresca (Figura 23 - J) e massa da matéria seca (Figura 23 - M), o tratamento de uma hora em PVS2, seguido pela imersão em NL (T4), apresentou menores valores, não diferindo de T3, porém não diferiu do tratamento de germinação direta (controle 1).

Para o segundo lote de sementes de *C. amethystoglossa* (cápsula 2), com umidade inicial de 49,4%, as plantas, após seis meses de aclimatização em casa de vegetação para todos os tratamentos, não apresentaram diferença para número de folhas (Figura 23 - B), área foliar (Figura 23 - E) e massa da matéria

fresca (Figura 23 - K). Para a variável massa da matéria seca (Figura 23 - N), o tratamento de uma hora em PVS2, seguido pela imersão em NL (T4), apresentou menores valores, porém não diferiu do tratamento de germinação direta (controle 1).

Já o terceiro lote de sementes de *C. amethystoglossa* (cápsula 3), com umidade inicial de 33,0%, as plantas, após seis meses de aclimatização em casa de vegetação para todos os tratamentos, não apresentaram diferença para área foliar (Figura 23 - F). Para massa da matéria fresca (Figura 23 - L) e massa da matéria seca (Figura 23 - O), o tratamento de uma hora em PVS2, seguido pela imersão em NL (T4), apresentou menores valores, não diferindo de T3 para massa de matéria fresca e não diferindo do tratamento germinação direta (controle 1). Entretanto para número de folhas (Figura 23 - C), o tratamento de uma hora em PVS2, seguido pela imersão em NL (T4), apresentou valores superiores aos demais tratamentos, não diferindo de T3.

Após seis meses de aclimatização em casa de vegetação, as plantas de todos os tratamentos de *C. loddigesii*, oriundas do primeiro lote de sementes (cápsula 1) com umidade inicial de 55,9%, não apresentaram diferença para as variáveis número de folhas (Figura 25 - A) e volume radicular (Figura 25 - E). Para as variáveis área foliar (Figura 25 - C), massa da matéria fresca (Figura 25 - G) e massa da matéria seca (Figura 25 - I), o tratamento de uma hora em PVS2, seguido pela imersão em NL (T4), apresentou menores valores em relação ao tratamento de 30 minutos em PVS2, seguido pela imersão em NL (T3), porém não diferiu da germinação direta das sementes (controle 1) e do tratamento de imersão por uma hora em PVS2 sem NL (controle 2).

Para o segundo lote de sementes de *C. loddigesii* (cápsula 2) com umidade inicial de 23,8%, as plantas, após seis meses de aclimatização em casa de vegetação para todos os tratamentos, não apresentaram diferença para número de folhas (Figura 25 - B), área foliar (Figura 25 - D) e volume radicular (Figura 25 - F). Para as variáveis massa da matéria fresca (Figura 25 - H) e massa da matéria seca (Figura 25 - J), os tratamentos de imersão por uma hora em PVS2, seguido pela imersão em NL (T4) e imersão direta das sementes em NL (T5), apresentaram valores inferiores à germinação direta das sementes (controle 1), entretanto não diferiram dos tratamentos de imersão por uma hora

em PVS2 sem NL (controle 2) e imersão por 30 minutos em PVS2, seguido pela imersão em NL (T3).

### 5.1.3.2. Análises fisiológicas

A variável fisiológica índice de verde do híbrido e das quatro espécies após seis meses de aclimatização em casa de vegetação não foi afetada e aumentou em relação ao período após o cultivo *in vitro*, independentemente do tratamento ou da umidade inicial das sementes (Figura 26 - A, B e C; Figura 27 - A, B e C; Figura 28 - A e B). Os valores de  $F_v/F_m$  para o híbrido e para as quatro espécies também aumentaram após a aclimatização, estando as médias superiores a 0,75 (Figura 26 - D, E e F; Figura 27 - D, E e F; Figura 28 - C e D), o que indica que o fotossistema II funcionou adequadamente. O PI das plantas, para o híbrido e para as quatro espécies, apresentou resultados semelhantes ao  $F_v/F_m$ , ambos aumentaram após a aclimatização (Figura 26 - G, H e I; Figura 27 - G, H e I; Figura 28 - E e F).

Uma das fases mais críticas da propagação *in vitro* de orquídeas é a aclimatização das plântulas, pois elas são retiradas de um ambiente controlado com alta umidade relativa e baixa intensidade luminosa. Quando essas plântulas são expostas ao ambiente externo, passam por um momento de estresse que pode levar à morte (Deb e Imchen, 2010). No entanto, diante destes resultados, observa-se, na aclimatização, que as plantas foram tolerantes às novas condições do ambiente *ex vitro*. O aumento na intensidade da luz da sala de cultivo para a casa de vegetação aumentou a eficiência do processo fotossintético, não havendo fotoinibição. Por consequência, a criopreservação das sementes, seja por vitrificação ou imersão direta em NL, não prejudicou a aclimatização das plantas.

O *habitat* das espécies de orquídeas do gênero *Cattleya* inclui áreas quentes e úmidas nas Américas Central e do Sul (Pridgeon e Morrison, 2005). Segundo Menezes (2014), um bom substrato de crescimento para as espécies de orquídeas do gênero *Cattleya* deve ter como atributos boa porosidade, capacidade de retenção de água e drenagem. As condições de casa de vegetação, o manejo e o substrato utilizados neste trabalho proporcionaram um ambiente adequado para o crescimento bem-sucedido das plantas e a obtenção de 100% de sobrevivência, para o híbrido e para as quatro espécies. O restante

das plantas oriundas deste experimento, não utilizadas nas análises destrutivas, também foi aclimatizado e está em casa de vegetação. É esperado que elas floresçam nos próximos anos.

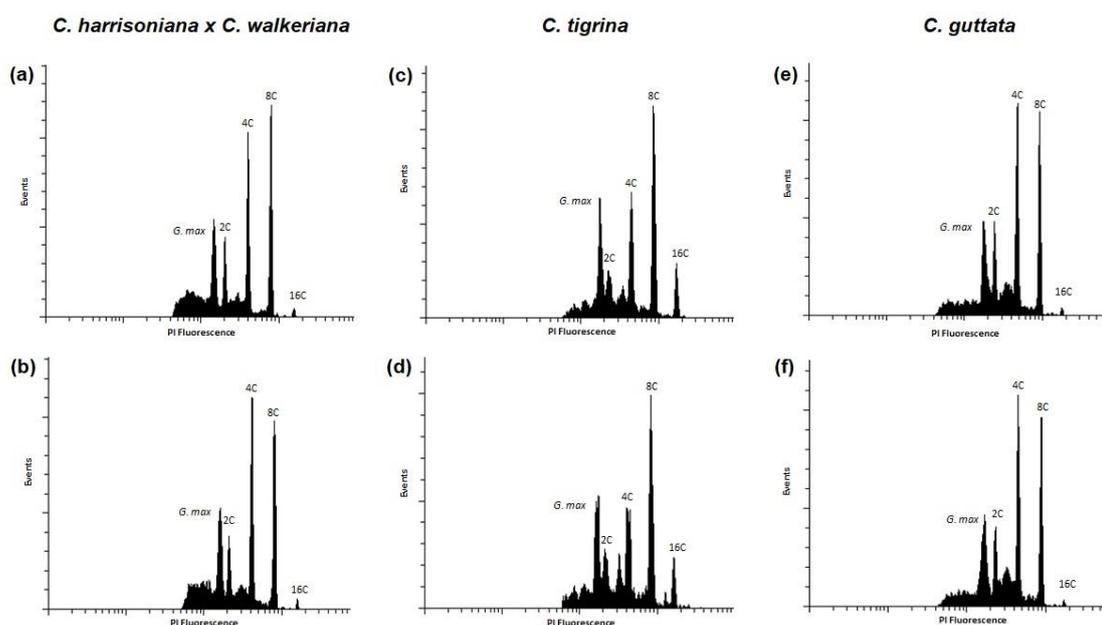
#### **5.1.4. Avaliação da estabilidade genética das plantas em citômetro de fluxo**

As amostras de núcleos isolados analisadas em citômetro de fluxo apresentaram o mesmo pico de conteúdo relativo de DNA (Tabelas 12, 13 e 14), resultando em histogramas similares (Figuras 32, 33 e 34), tanto para plantas provenientes de sementes não criopreservadas, quanto para plantas provenientes de sementes criopreservadas. Sendo assim, nenhuma alteração no conteúdo de DNA analisado ocorreu nas plantas resultantes de sementes criopreservadas, para o híbrido e para as quatro espécies, sugerindo que não houve alteração nos níveis de ploidia. Esses resultados atestam que a utilização do PVS2 não ocasionou instabilidade genética às plantas obtidas de sementes criopreservadas. Segundo Engelmann (2004) e Harding (2004), a integridade genética do material é essencial quando a criopreservação é empregada como meio para a conservação de germoplasma. No entanto, ainda não existem na literatura relatos mostrando mudanças nos níveis fenotípico, bioquímico, cromossômico ou molecular atribuídos aos sistemas de armazenamento por criopreservação (Cerna et al., 2018).

**Tabela 12.** Médias de conteúdo de DNA, determinado por citometria de fluxo, de plantas do híbrido de *C. harrisoniana* x *C. walkeriana*, *C. tigrina* e *C. guttata* provenientes de sementes criopreservadas, após um ano de cultivo *in vitro*. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.

Tratamento	<i>C. harrisoniana</i> x <i>C. walkeriana</i>		<i>C. tigrina</i>		<i>C. guttata</i>	
	Conteúdo DNA (pg)	CV (%)	Conteúdo DNA (pg)	CV (%)	Conteúdo DNA (pg)	CV (%)
T1	3,69	4,65	3,70	4,47	3,35	4,69
T2	3,36	4,72	3,71	4,56	3,70	3,8
T3	3,64	4,62	3,64	4,52	3,67	4,32
T4	3,65	4,68	3,52	4,5	3,49	4,9
T5	-	-	-	-	3,52	4,16

T1 - Germinação direta (Controle 1); T2 - uma hora em PVS2 sem NL (Controle 2); T3 - 30 minutos em PVS2 + NL; T4 - uma hora em PVS2 + NL; T5 - Imersão direta em NL sem PVS2.

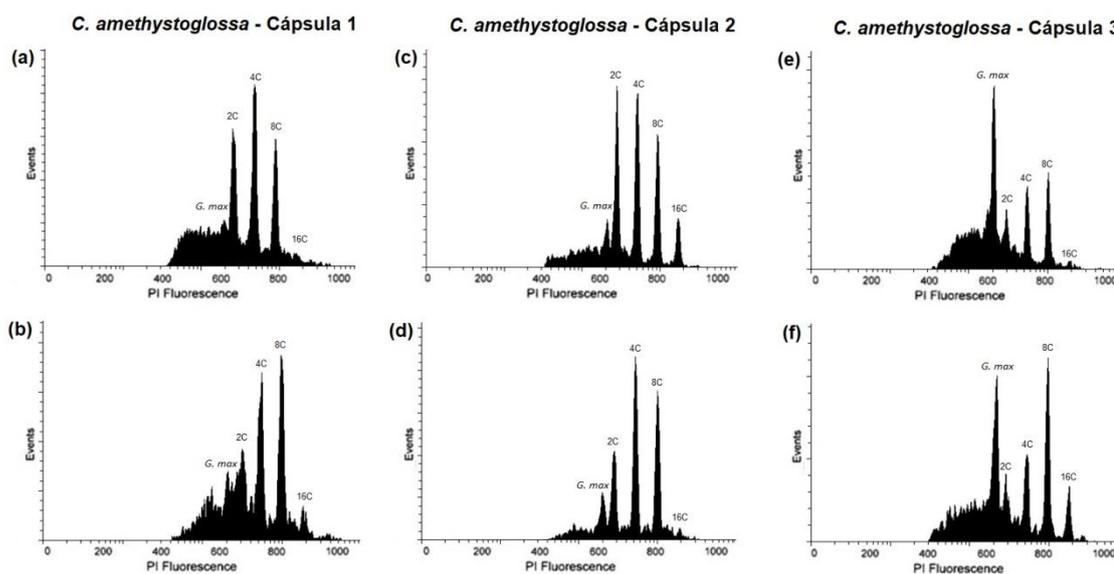


**Figura 32.** Histogramas de citometria de fluxo obtidos de plantas oriundas de sementes criopreservadas do híbrido de *C. harrisoniana* x *C. walkeriana* (a) Germinação direta (Controle 1) (3,69 pg) e (b) uma hora em PVS2 + NL (3,65 pg); *C. tigrina* (c) Germinação direta (Controle 1) (3,70 pg) e (d) uma hora em PVS2 + NL (3,52 pg) e *C. guttata* (e) Germinação direta (Controle 1) (3,35 pg) e (f) Imersão direta em NL sem PVS2 (3,52 pg) germinadas *in vitro*. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.

**Tabela 13.** Médias de conteúdo de DNA, determinado por análise de citometria de fluxo de plantas de *C. amethystoglossa* provenientes de sementes criopreservadas, após um ano de cultivo *in vitro*. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.

Tratamento	<i>C. amethystoglossa</i> Cápsula 1		<i>C. amethystoglossa</i> Cápsula 2		<i>C. amethystoglossa</i> Cápsula 3	
	Conteúdo DNA (pg)	CV (%)	Conteúdo DNA (pg)	CV (%)	Conteúdo DNA (pg)	CV (%)
T1	3,72	4,30	3,40	4,64	3,61	4,68
T2	3,56	4,93	3,48	4,54	3,59	4,65
T3	3,70	4,54	3,45	4,34	3,40	4,65
T4	3,69	4,60	3,53	4,21	3,44	4,74

T1 - Germinação direta (Controle 1); T2 - uma hora em PVS2 sem NL (Controle 2); T3 - 30 minutos em PVS2 + NL; T4 - uma hora em PVS2 + NL; T5 - Imersão direta em NL sem PVS2.

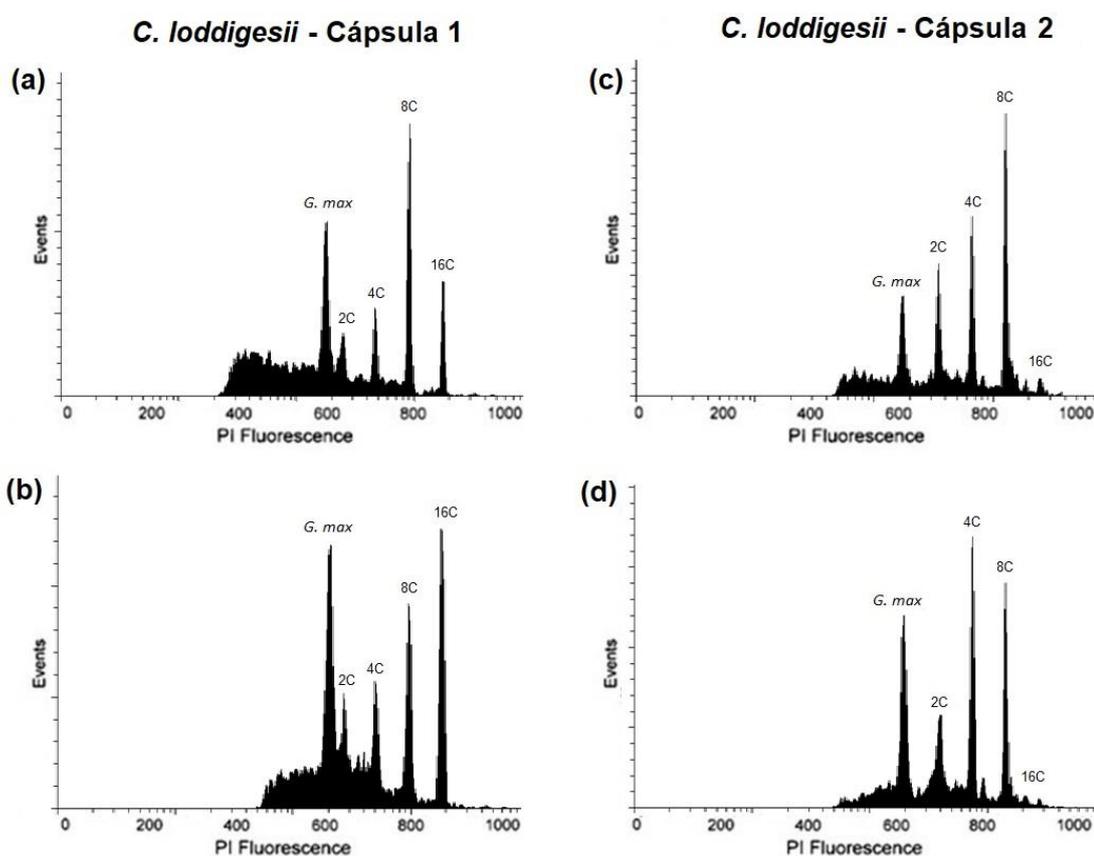


**Figura 33.** Histogramas de citometria de fluxo obtidos de plantas oriundas de sementes criopreservadas de *C. amethystoglossa* - Cápsula 1 (a) Germinação direta (Controle 1) (3,72 pg) e (b) uma hora em PVS2 + NL (3,69 pg); *C. amethystoglossa* - Cápsula 2 (c) Germinação direta (Controle 1) (3,40 pg) e (d) uma hora em PVS2 + NL (3,53 pg) e *C. amethystoglossa* - Cápsula 3 (e) Germinação direta (Controle 1) (3,61 pg) e (f) uma hora em PVS2 + NL (3,44 pg) germinadas *in vitro*. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.

**Tabela 14.** Médias de conteúdo de DNA, determinado por análise de citometria de fluxo de plantas de *C. loddigesii* provenientes de sementes criopreservadas, após um ano de cultivo *in vitro*. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.

Tratamento	<i>C. loddigesii</i> Cápsula 1		<i>C. loddigesii</i> Cápsula 2	
	Conteúdo DNA (pg)	CV (%)	Conteúdo DNA (pg)	CV (%)
T1	3,50	4,67	5,16	3,53
T2	3,45	4,03	5,33	3,60
T3	3,42	3,75	5,36	3,93
T4	3,34	4,44	4,96	4,47

T1 - Germinação direta (Controle 1); T2 - uma hora em PVS2 sem NL (Controle 2); T3 - 30 minutos em PVS2 + NL; T4 - uma hora em PVS2 + NL; T5 - Imersão direta em NL sem PVS2.



**Figura 34.** Histogramas de citometria de fluxo obtidos de plantas oriundas de sementes criopreservadas de *C. loddigesii* - Cápsula 1 (a) Germinação direta (Controle 1) (3,5 pg) e (b) uma hora em PVS2 + NL (3,34 pg) e *C. loddigesii* - Cápsula 2 (c) Germinação direta (Controle 1) (5,16 pg) e (d) uma hora em PVS2 + NL (4,96 pg) germinadas *in vitro*. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.

Os coeficientes de variação observados neste trabalho foram inferiores a 5% para as médias de conteúdo de DNA (Tabelas 12, 13 e 14). Vários autores

mostraram a importância do coeficiente de variação do pico G1 para boas estimativas do conteúdo de DNA. O valor de 5% foi determinado para o coeficiente de variação da citometria de fluxo como critério para a aceitação de estimativas do conteúdo de DNA (Galbraith et al., 2001).

O conteúdo de DNA nuclear revelou polissomatia para todas as espécies, sendo observados quatro picos estimados em 2C, 4C, 8C e 16C nos núcleos extraídos das folhas de plantas provenientes de sementes criopreservadas e sementes não criopreservadas (controle) (Figuras 32, 33 e 34). A ocorrência de diferentes níveis de ploidia entre as células de um organismo é comum em algumas famílias de plantas, com o grau de polissomatia diferindo entre os órgãos e tecidos. A polissomatia é geralmente órgão-específica e está relacionada ao desenvolvimento da planta (Barow e Meister, 2003).

A presença de polissomatia observada neste trabalho nas espécies do gênero *Cattleya* também foi relatada em outros gêneros de orquídeas, como *Cymbidium* (Fukai et al., 2002), *Vanda* (Lim e Loh, 2003), *Polystachya* (Rupp et al., 2010), *Spathoglottis* (Yang e Loh, 2004) e *Vanilla* (Lepers - Andrzejewski et al., 2011).

A polissomatia é um mecanismo adaptativo que mantém a homeostase de um organismo para sobrevivência em condições de estresses bióticos e abióticos (Lee et al., 2009). Alguns autores relacionam esse fenômeno a um aumento na expressão de certos genes e no controle do crescimento das folhas (Bourdon et al., 2011; Massonnet et al., 2011).

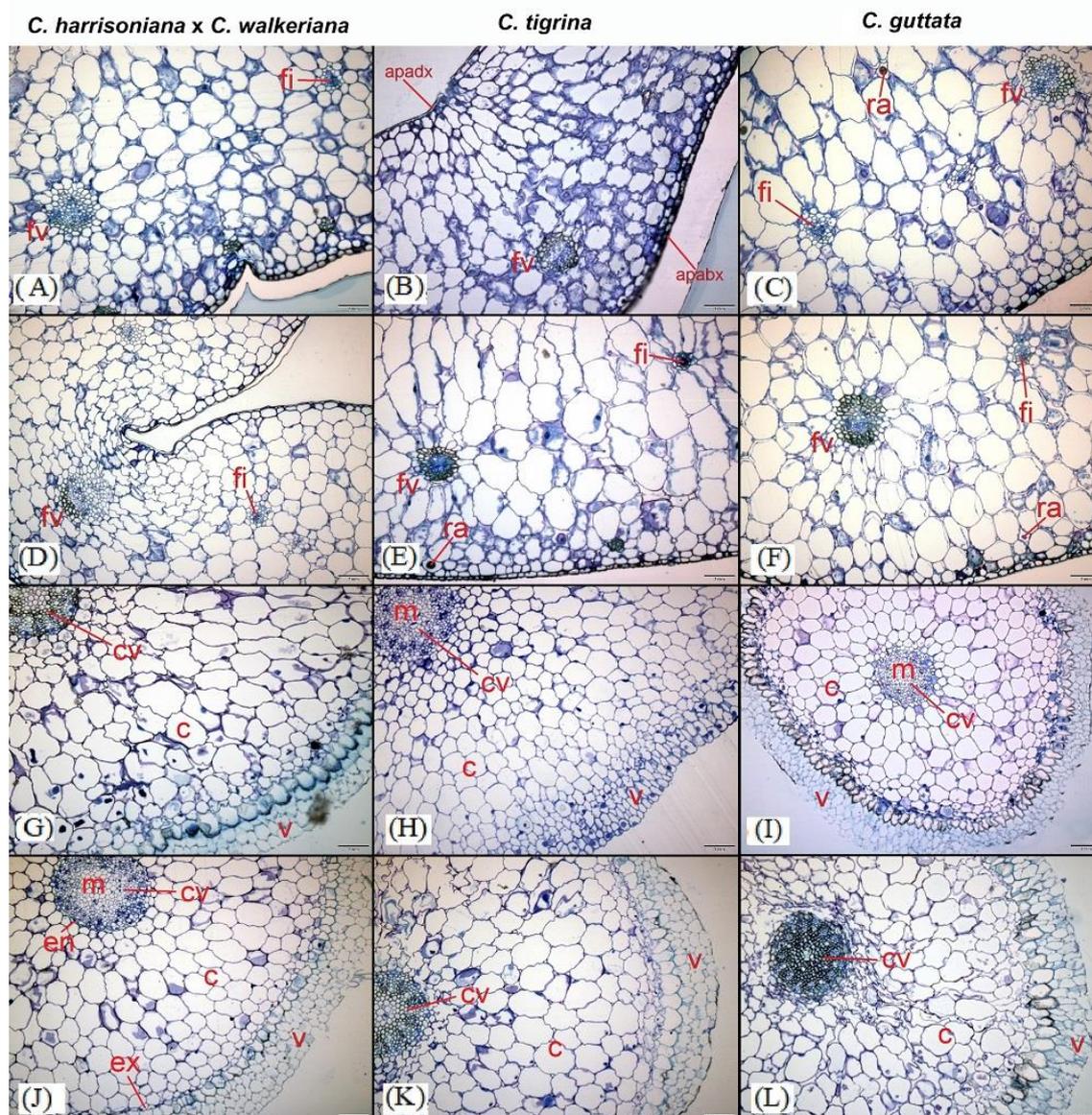
#### **5.1.5. Análise anatômica das plantas em microscópio óptico**

A análise anatômica das plantas aclimatizadas revelou que as folhas das espécies estudadas apresentaram características anatômicas semelhantes, tanto para plantas provenientes de sementes não criopreservadas quanto para plantas provenientes de sementes criopreservadas. Em seção transversal, todas as folhas analisadas apresentaram feixe vascular bem desenvolvido e feixes de fibras dispostos próximos às faces adaxial e abaxial ao longo de todas as folhas (Figura 35, A-F; Figura 36, A-F e Figura 37, A-D).

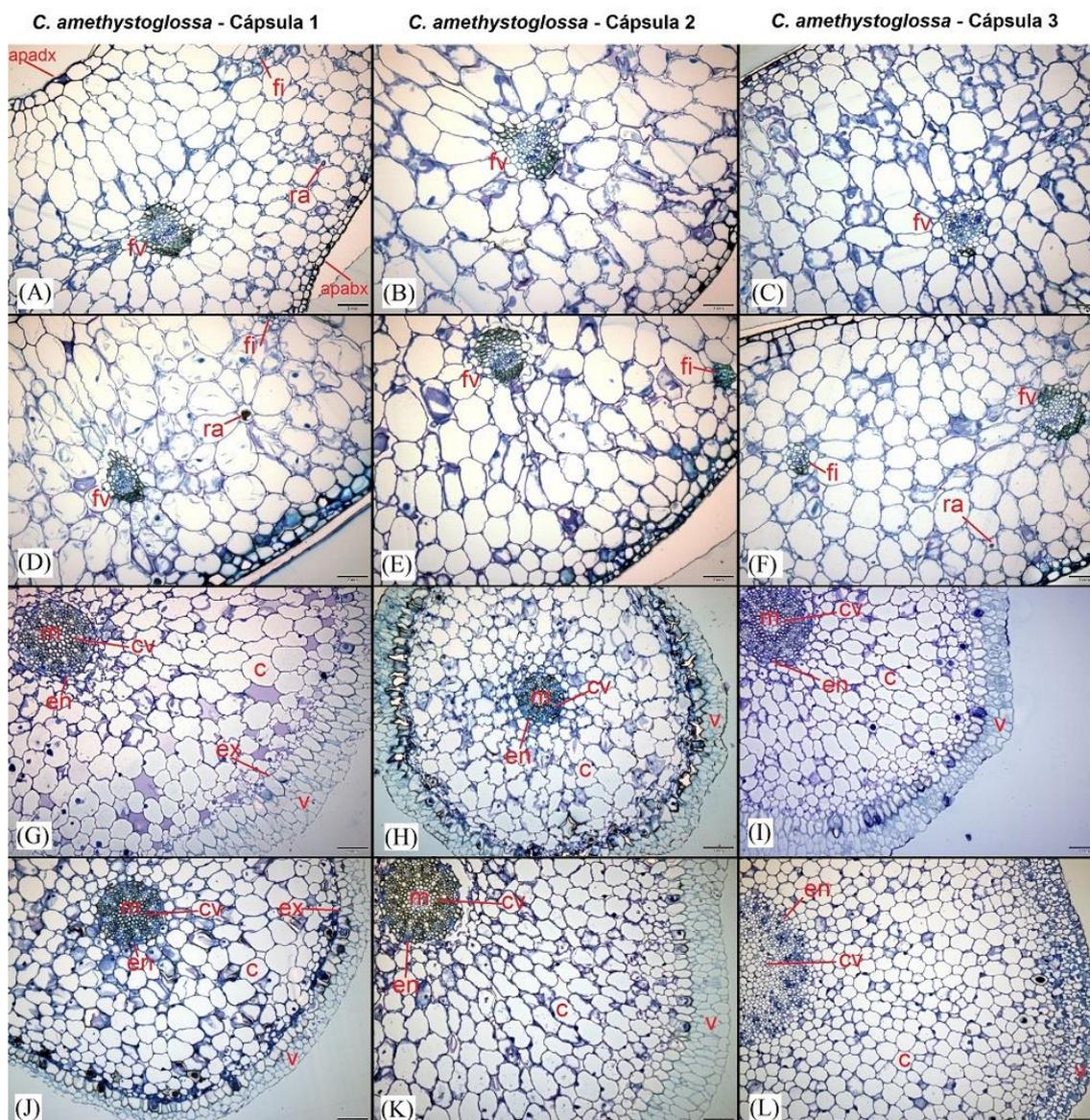
No mesofilo das plantas de *C. tigrina*, *C. guttata*, *C. amethystoglossa* e *C. loddigesii*, foram observados idioblastos contendo ráfides (Figura 35, B e C; E e F;

Figura 36, A, D e F; Figura 37, A, C e D). Segundo Zindler-Frank et al. (2001), a presença das ráfides, cristais aciculares que se formam por deposição de oxalato de cálcio nos diferentes órgãos de uma planta, está diretamente relacionada com a quantidade de cálcio disponível para a planta. A ocorrência desses cristais pode estar associada ao processo de eliminação do excesso de cálcio no citosol (Kostman et al., 2001). O meio de cultivo e o adubo B&G Orquídeas<sup>®</sup> são ricos em macro e micronutrientes, com um teor alto de cálcio (2,4%). Assim, a presença de idioblastos com ráfides observadas nas plantas de *C. tigrina*, *C. guttata*, *C. amethystoglossa* e *C. loddigesii*, pode estar relacionada à utilização do meio de cultivo e do adubo B&G Orquídeas<sup>®</sup>.

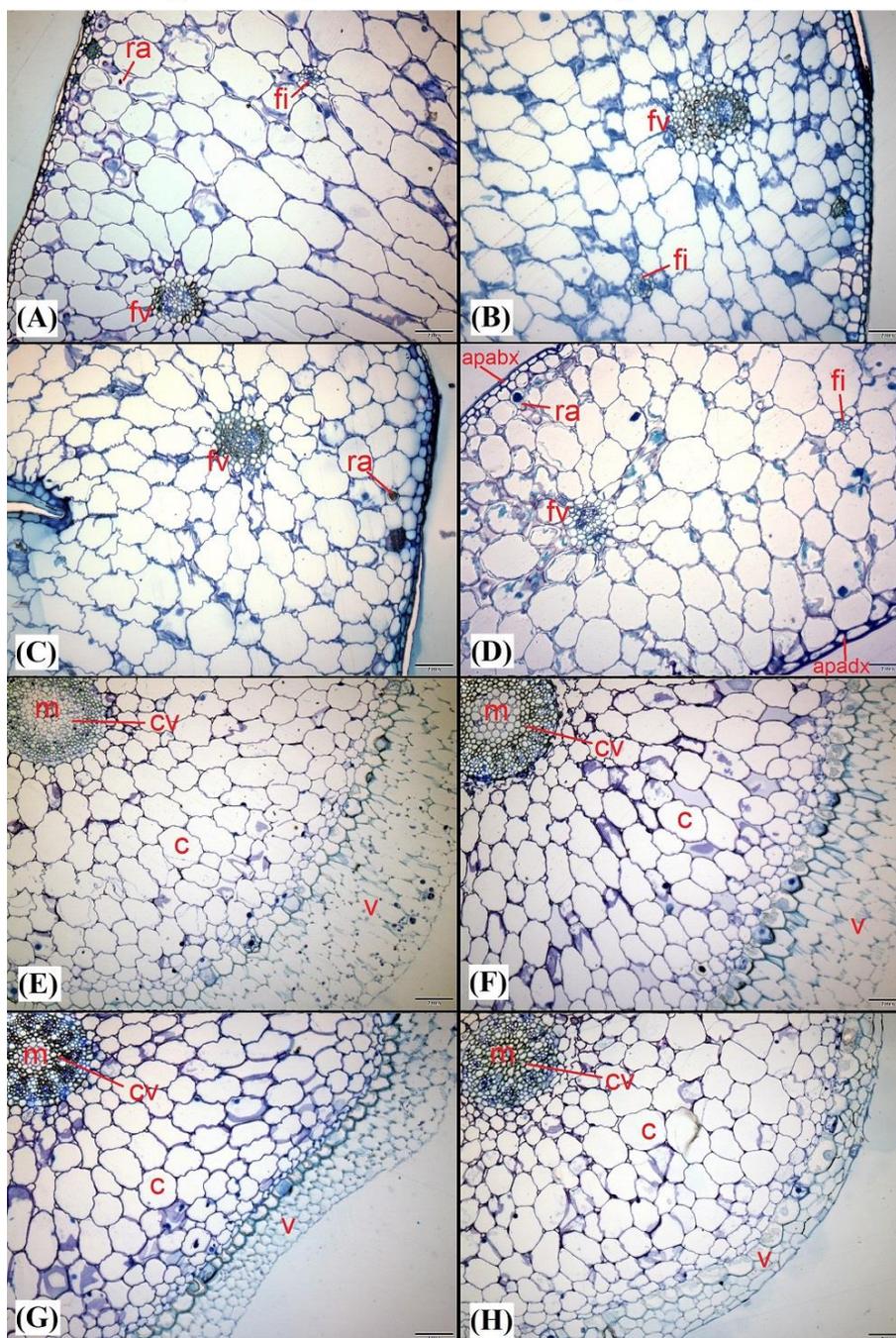
As raízes em cortes transversais apresentaram diâmetro semelhante (Figura 35, G-L; Figura 36, G-L e Figura 37, E-H), com características típicas da família Orchidaceae, como velame, córtex com exoderme e endoderme bem definidas e cilindro vascular poliarco (Mayer et al., 2008). As plantas provenientes de sementes criopreservadas e as plantas provenientes de sementes não criopreservadas apresentaram características anatômicas semelhantes, tanto para folha quanto para raiz (Figuras 35, 36 e 37).



**Figura 35.** Estrutura anatômica foliar e radicular do híbrido de *C. harrisoniana* x *C. walkeriana*, *C. tigrina* e *C. guttata* após seis meses de aclimatização. (A), (B), (C), (D), (E) e (F) – Secção transversal da porção mediana da folha (A), (B) e (C) – Secções de plantas provenientes de sementes não criopreservadas (controle) e (D), (E) e (F) – Secções de plantas provenientes de sementes criopreservadas; (G), (H), (I), (J), (K) e (L) – Secções transversais da porção mediana da raiz (G), (H) e (I) – Secções de plantas provenientes de sementes não criopreservadas (controle) e (J), (K) e (L) – Secções de plantas provenientes de sementes criopreservadas; (c = córtex; en = endoderme; epabx = epiderme abaxial; epadx = epiderme adaxial; ex = exoderme; fi = fibras; fv = feixe vascular; m = medula; ra = idioblastos com ráfides; v = velame). Barras = 200  $\mu$ m. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.



**Figura 36.** Estrutura anatômica foliar e radicular de *C. amethystoglossa* - Cápsulas 1, 2 e 3 após seis meses de aclimatização. (A), (B), (C), (D), (E) e (F) – Secção transversal da porção mediana da folha (A), (B) e (C) – Secções de plantas provenientes de sementes não criopreservadas (controle) e (D), (E) e (F) – Secções de plantas provenientes de sementes criopreservadas; (G), (H), (I), (J), (K) e (L) – Secções transversais da porção mediana da raiz (G), (H) e (I) – Secções de plantas provenientes de sementes não criopreservadas (controle) e (J), (K) e (L) – Secções de plantas provenientes de sementes criopreservadas; (c = córtex; en = endoderme; epabx = epiderme abaxial; epadx = epiderme adaxial; ex = exoderme; fi = fibras; fv = feixe vascular; m = medula; ra = idioblastos com ráfides; v = velame). Barras = 200  $\mu$ m. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.

*C. loddigesii* - Cápsula 1*C. loddigesii* - Cápsula 2

**Figura 37.** Estrutura anatômica foliar e radicular de *C. loddigesii* - Cápsulas 1 e 2 após seis meses de aclimatização. (A), (B), (C) e (D) – Secção transversal da porção mediana da folha (A) e (B) – Secções de plantas provenientes de sementes não criopreservadas (controle) (C) e (D) – Secções de plantas provenientes de sementes criopreservadas; (E), (F), (G) e (H) – Secções transversais da porção mediana da raiz (E) e (F) – Secções de plantas provenientes de sementes nãocriopreservadas (controle) e (G) e (H) – Secções de plantas provenientes de sementes criopreservadas; (c = córtex; en = endoderme; epabx = epiderme abaxial; epadx = epiderme adaxial; ex = exoderme; fi = fibras; fv = feixe vascular; m = medula; ra = idioblastos com ráfides; v = velame). Barras = 200 µm. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.

Para a criopreservação de germoplasma, é particularmente importante que o material criopreservado produza plantas idênticas ao fenótipo original (Dumet e Benson, 2000). Neste trabalho, as plantas do híbrido de *C. harrisoniana* x *C. walkeriana*, de *C. tigrina*, de *C. guttata*, de *C. amethystoglossa* e de *C. loddigesii*, obtidas após a criopreservação das sementes, pela técnica de vitrificação ou pela imersão direta das sementes em NL, apresentaram fenótipos, morfologia e anatomia normais e sem alterações no nível de ploidia em relação às plantas do controle.

A falta de trabalhos envolvendo a criopreservação de orquídeas do gênero *Cattleya* se dá possivelmente pelo fato de o crescimento ser mais lento em relação a outras espécies, como o *Dendrobium*, desde a obtenção da cápsula até as plantas floridas. Isso reforça a importância deste trabalho, que apresenta o processo de criopreservação das sementes desde a polinização até a obtenção das plantas aclimatizadas.

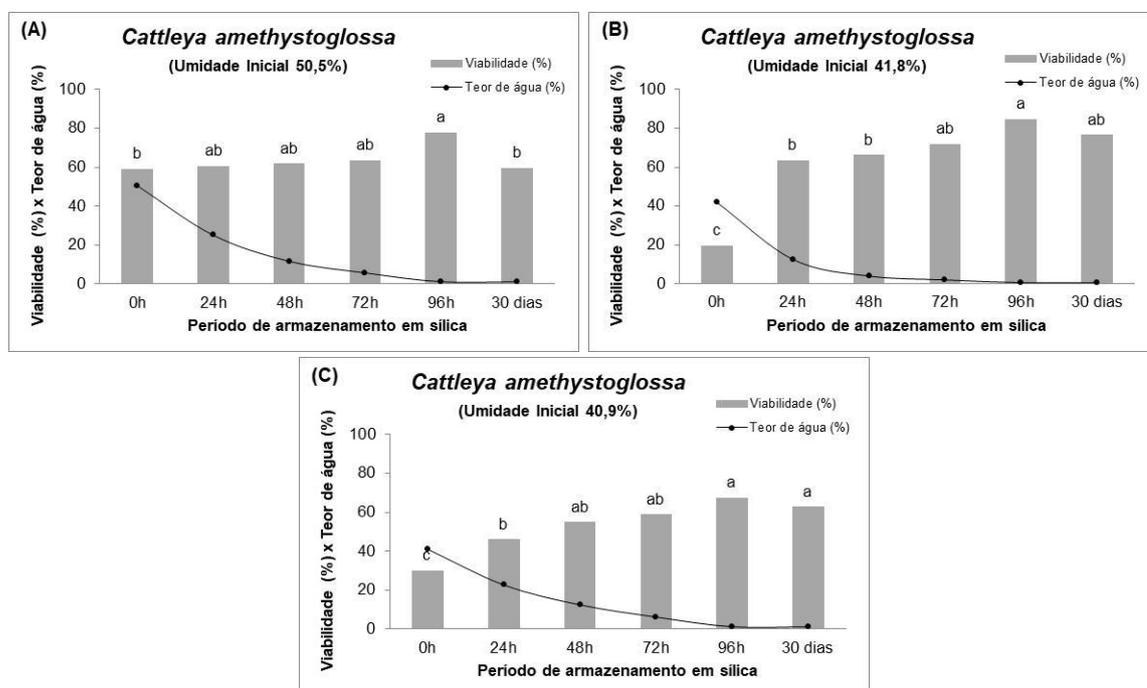
Este trabalho relata pela primeira vez a criopreservação de sementes do híbrido de *C. harrisoniana* x *C. walkeriana*, de *C. tigrina*, de *C. amethystoglossa* e de *C. loddigesii* pelo método de vitrificação, e a criopreservação de *C. guttata* pela imersão direta das sementes em NL até a obtenção de plantas inteiras aclimatizadas.

A criopreservação por vitrificação de sementes mostrou-se um método eficaz e necessário para a conservação de sementes imaturas do híbrido de *C. harrisoniana* x *C. walkeriana* e das espécies de *C. tigrina*, *C. amethystoglossa* e *C. loddigesii* com alto teor de água, nas condições descritas neste trabalho.

## **5.2. Experimento de criopreservação pela técnica de desidratação**

Para as sementes criopreservadas de *C. amethystoglossa*, com umidade inicial de 50,5% (cápsula 1), a maior viabilidade foi observada no tempo de exposição de 96h em sílica gel (não diferindo dos tempos de 24h, 48h e 72h) (Figura 38 - A). Enquanto as sementes expostas diretamente (0h) no NL ou após 30 dias em sílica gel apresentaram menor taxa de viabilidade em relação ao tempo de exposição de 96h em sílica gel. Mesmo sendo mantidas em sílica gel na geladeira (4°C), as sementes de *C. amethystoglossa*, com umidade inicial de

50,5%, perderam a viabilidade após o período de 30 dias, quando comparadas ao tempo de exposição de 96h em sílica gel.



**Figura 38.** Viabilidade de sementes (%) criopreservadas de *C. amethystoglossa* avaliada por 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio (TTC) em função do teor de água (%) nos tempos 0h, 24h, 48h, 72h, 96h e 30 dias em sílica gel (4°C) antes da imersão em NL. (A) Umidade inicial de 50,5% (cápsula 1); (B) Umidade inicial de 41,8% (cápsula 2); (C) Umidade inicial de 40,9% (cápsula 3). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.

Para as sementes criopreservadas de *C. amethystoglossa* com umidade inicial de 41,8% (cápsula 2), a maior viabilidade foi observada no tempo de exposição de 96h em sílica gel, não diferindo dos tempos de 72h e 30 dias (Figura 38 - B). Enquanto as sementes expostas diretamente (0h) no NL apresentaram menor taxa de viabilidade em relação aos demais tratamentos.

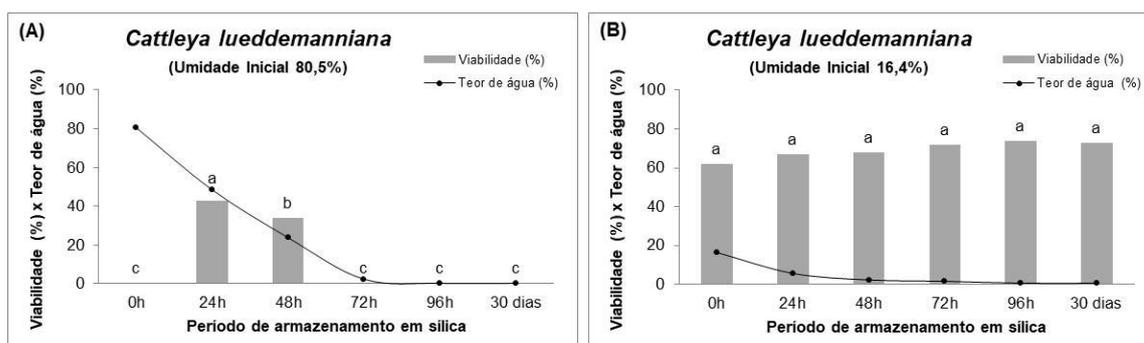
Para as sementes criopreservadas de *C. amethystoglossa* com umidade inicial de 40,9% (cápsula 3), a maior viabilidade foi observada nos tempos de exposição de 96h e 30 dias em sílica gel, não diferindo dos tempos de 48h e 72h (Figura 38 - C). Enquanto as sementes expostas diretamente (0h) no NL apresentaram menor taxa de viabilidade em relação aos demais tratamentos.

Para os três lotes de sementes de *C. amethystoglossa* com umidade inicial entre 50,5% e 40,9%, o armazenamento em sílica gel por 96h foi fundamental para garantir a viabilidade das sementes criopreservadas, que tinham alta umidade inicial (Figura 38 - A, B e C). Enquanto as sementes criopreservadas apresentaram menor viabilidade nos tempos de exposição em sílica gel inferiores à 96h, para os três lotes.

O armazenamento em sílica gel reduziu o conteúdo de água livre das sementes com alta umidade, evitando a formação de maior número de cristais de gelo ao serem imersas em NL e, conseqüentemente, aumentou a taxa de viabilidade. A alta umidade das sementes contribuiu para esses resultados. Por conseqüência, para *C. amethystoglossa*, sementes com umidade inicial entre 40 e 50% devem ser armazenadas por 96h em sílica gel em geladeira antes da imersão em NL.

Para as sementes criopreservadas de *C. lueddemanniana* com umidade inicial de 80,5% (cápsula 1), a maior viabilidade foi observada no tempo de exposição de 24h em sílica gel (Figura 39 - A), seguido pelo tempo de 48h em sílica gel. Enquanto as sementes expostas diretamente (0h) no NL ou por períodos superiores a 48h em sílica gel não apresentaram viabilidade. O armazenamento em sílica gel por 24h foi fundamental para garantir a viabilidade das sementes criopreservadas. O período de 24h em sílica gel reduziu o conteúdo de água livre das sementes, evitando a formação de maior número de cristais de gelo ao serem imersas em NL e, conseqüentemente, aumentou a taxa de viabilidade.

Para sementes ortodoxas, espera-se um aumento na sua longevidade após a redução do teor de água por agentes dessecantes, entretanto as sementes de *C. lueddemanniana* com alta umidade inicial (80,5%) apresentaram baixa longevidade, mesmo sendo mantidas em sílica gel na geladeira (4°C). A exposição em sílica gel por períodos superiores a 48h pode ter desidratado as sementes em excesso, levando à sua perda da viabilidade. A desidratação parece ser promissora para a criopreservação de sementes com elevado teor de água, desde que o período de armazenamento em sílica gel para desidratação seja rápido e as sementes sejam colocadas imediatamente no NL.



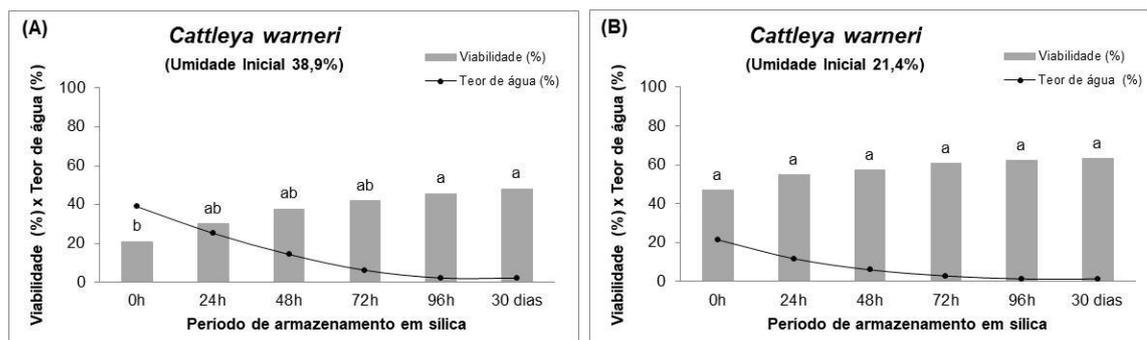
**Figura 39.** Viabilidade de sementes (%) criopreservadas de *C. lueddemanniana* avaliada por 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio (TTC) em função do teor de água (%) nos tempos 0h, 24h, 48h, 72h, 96h e 30 dias em sílica gel (4°C) antes da imersão em NL. (A) Umidade inicial de 80,5% (cápsula 1); (B) Umidade inicial de 16,4% (cápsula 2). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.

A perda da viabilidade das sementes com o avanço de período de armazenamento já havia sido observada por Pardo e Ferreira (2006) para sementes de *C. intermedia*, *C. bicolor* e *C. labiata* armazenadas a  $5\pm 1^{\circ}\text{C}$ , entretanto o teor de água das sementes antes do armazenamento estava próximo de 6% e a viabilidade das sementes foi verificada semestralmente. Neste trabalho, as sementes de *C. lueddemanniana* com alta umidade inicial (80,5%) perderam a viabilidade após o período de 48h, mesmo sendo mantidas em sílica gel na geladeira (4°C).

Para as sementes criopreservadas de *C. lueddemanniana* com 16,4% de umidade inicial, não houve diferença para os diferentes tempos de exposição em sílica gel (Figura 39 - B). A desidratação das sementes em sílica gel não foi necessária, pois sua imersão direta em NL (tempo 0h) sem a prévia exposição em sílica gel foi eficaz, apresentando taxa de viabilidade de 61,7%, não diferindo dos demais tratamentos (Figura 39 - B). A baixa umidade das sementes contribuiu para esses resultados. Assim, para *C. lueddemanniana*, sementes com 16,4% de umidade podem ser imersas diretamente no NL, já sementes com 80,5% de umidade devem ser armazenadas por 24h em sílica gel em geladeira antes da imersão em NL.

Para as sementes de *C. warneri* com 38,9% de umidade inicial, as maiores taxas de viabilidade foram observadas nos tempos de 96h e 30 dias em sílica gel, não diferindo dos outros períodos de armazenamento em sílica gel superiores a 24h. O armazenamento em sílica gel por tempo igual ou superior a

24h foi fundamental para aumentar a taxa de viabilidade das sementes criopreservadas (Figura 40 - A). O armazenamento em sílica gel reduziu o conteúdo de água livre das sementes com 38,9% de umidade, evitando a formação de maior número de cristais de gelo ao serem imersas em NL e, conseqüentemente, aumentou a taxa de viabilidade das sementes.



**Figura 40.** Viabilidade de sementes (%) criopreservadas de *C. warneri* avaliada por 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio (TTC) em função do teor de água (%) nos tempos 0h, 24h, 48h, 72h, 96h e 30 dias em sílica gel (4°C) antes da imersão em NL. (A) Umidade inicial de 38,9% (cápsula 1); (B) Umidade inicial de 21,4% (cápsula 2). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. Campos dos Goytacazes - RJ, 2020.

Para as sementes criopreservadas de *C. warneri* com 21,4% de umidade inicial, não houve diferença para os diferentes tempos de exposição em sílica gel (Figura 40 - B). A desidratação em sílica gel não foi necessária, pois a imersão direta em NL foi eficaz (tempo 0h), apresentando taxa de viabilidade de 46,5%, não diferindo dos demais tratamentos (Figura 40 - B). A baixa umidade das sementes (21,4%) contribuiu para esses resultados.

Portanto, para a espécie *C. warneri*, sementes com 21,4% de umidade podem ser imersas diretamente no NL, já sementes com 38,9% de umidade devem ser armazenadas em sílica gel por, no mínimo, 24h, em geladeira, antes da imersão em NL.

A criopreservação por desidratação de sementes mostrou-se um método eficaz e necessário para a conservação de sementes imaturas de *C. amethystoglossa*, *C. lueddemanniana* e *C. warneri*, nas condições descritas neste trabalho.

Os dados obtidos neste trabalho poderão ser utilizados na implantação de bancos criogênicos de sementes maduras e imaturas envolvendo essas espécies, abrindo a possibilidade para outras espécies ou híbridos da família Orchidaceae.

## 6. CONCLUSÕES

A exposição das sementes imaturas do híbrido de *C. harrisoniana* x *C. walkeriana* e das espécies de *C. tigrina*, *C. amethystoglossa* e *C. loddigesii* por uma hora em PVS2, antes da imersão em NL, foi benéfica ao processo de criopreservação. Enquanto para *C. guttata*, a imersão direta das sementes maduras com baixo teor de água em NL foi eficaz, não sendo necessária a utilização da vitrificação.

As plantas obtidas após a criopreservação das sementes apresentaram fenótipos, morfologia e anatomia normais e sem alterações no nível de ploidia em relação às plantas do controle.

Para *C. amethystoglossa*, sementes com umidade inicial entre 40 e 50% devem ser desidratadas por 96h em sílica gel em geladeira antes da imersão em NL. Para *C. lueddemanniana*, sementes com 16,4% de umidade inicial podem ser imersas diretamente no NL, já sementes com 80,5% de umidade inicial devem ser desidratadas por 24h em sílica gel em geladeira antes da imersão em NL. Para a espécie *C. warneri*, sementes com 21,4% de umidade inicial podem ser imersas diretamente no NL, já as sementes com 38,9% de umidade inicial devem ser desidratadas em sílica gel por, no mínimo, 24h em geladeira antes da imersão em NL.

De forma geral, a criopreservação pelas técnicas de vitrificação e desidratação foi eficiente e necessária para a conservação das sementes imaturas de orquídeas do gênero *Cattleya* utilizadas neste trabalho.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ai, P., Lu, L., Song, J. (2012) Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of *Rabdosia rubescens* by encapsulation-dehydration and evaluation of their genetic stability. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 108:381-387.
- Arditti, J. (2008) Micropropagation of Orchids. 2 volume set, 2nd edn. Oxford, UK: Wiley-Blackwell, 1560p.
- Arditti, J., Ernst, R. (1984) Physiology of orchid seed germination. In: Arditti, J. (Ed.), *Orchid Biology: Reviews and Perspectives III*. Cornell University Press, New York, p.177-222.
- Barow, M., Meister, A. (2003) Endopolyploidy in seed plants is differently correlated to systematics, organ, life strategy and genome size. *Plant, Cell & Environment*, 26:571-584.
- Barros, F., Vinhos, F., Rodrigues, V.T., Barberena, F.F.V.A., Fraga, C.N., Pessoa, E.M., Forster, W., Menini Neto, L., Furtado, S.G., Nardy, C., Azevedo, C.O., Guimarães, L.R.S. (2016) Orchidaceae. In: *Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB179/>  
Acesso em: 20 Set. 2019.

- Bennett, M.D., Bhandol, P., Leitch, I.J. (2000) Nuclear DNA Amounts in Angiosperms and Their Modern Uses - 807 New Estimates. *Annals of Botany*, 86:859-909.
- Benson, E. E. (2008) Cryopreservation of phytodiversity: a critical appraisal of theory and practice. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 27:141-219.
- Björkman, O., Demming, B. (1987) Photon yield of O<sub>2</sub> evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77K among vascular plants of diverse origins. *Planta*, 170:489-504.
- Bolhàr-Nordenkamp, H.R., Long, S.P., Baker, N.R., Öquist, G., Schreiber, U., Lechner, E.G. (1989) Chlorophyll fluorescence as a probe of the photosynthetic competence of leaves in the field: a review of current instrumentation. *Functional Ecology*, 3:497-514.
- Bourdon, M., Coriton, O., Pirrello, J., Cheniclet, C., Brown, S.C., Poujol, C., Chevalier, C., Renaudin, J.P., Frangne, N. (2011) In planta quantification of endoreduplication using fluorescent *in situ* hybridization (FISH). *The Plant Journal*, 66:1089-1099.
- Bulpitt, C.J. (2005) The uses and misuses of orchids in medicine. *An International Journal of Medicine*, 98:625-631.
- Bulpitt, C.J., Li, Y., Bulpitt, P.F., Wang, J. (2007) The use of orchids in Chinese medicine. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 100:558-563.
- Carnevali, G., Cetzal-Ix, W., Balam, R. (2014) A new species of mule-ear *Oncidium* with straw-yellow flowers (Orchidaceae: Oncidiinae, Lophiaris) from central Panama. *Physiologist*, 162:165-173.
- Caswell, K.L., Kartha, K.K. (2009) Recovery of plants from pea and strawberry meristems cryopreserved for 28 years. *CryoLetters*, 30:41-46.
- Cerna, M., Valdivieso, P., Cella, R., Mátyás, B., Aucapiña, C. (2018) Cryopreservation of orchid seeds through rapid and step freezing methods. *F1000 Research*, 7, 209.
- Christen, D., Schonmann, S., Jermini, M., Strasser, R.J., Defago, G. (2007) Characterization and early detection of grapevine (*Vitis vinifera*) stress

responses to esca disease by in situ chlorophyll fluorescence and comparison with drought stress. *Environmental and Experimental Botany*, 60:504-514.

CNC Flora. (2016) Centro Nacional de Conservação da Flora. Disponível em: <http://cncflora.jbrj.gov.br/>. Acesso em: 17 Jun. 2019.

Dasgupta, M., Mohapatra, U., Nayak, N.R., Rath, S.P., Patnaik, S.N. (2004) Propagation and cultivation of orchids - a review. In: Britto, S.J. (Ed.), *Orchids: Biodiversity and Conservation - A Tissue Culture Approach*. INR, St Joseph's college, India, Tiruchirappalli, p.17-33.

Deb, C.R., Imchen, T. (2010) An efficient *in vitro* hardening technique of tissue culture raised plants. *Biotechnology*, 9(1):79-83.

Ding, F., Jin, S., Hong, N., Zhong, Y., Cao, Q., Yi, G., Wang, G. (2008) Vitrification - cryopreservation, an efficient method for eliminating *Candidatus Liberobacter asiaticus*, the citrus Huanglongbing pathogen, from *in vitro* adult shoot tips. *Plant Cell Reports*, 27:241-250.

Dolezel, J., Bartos, J. (2005) Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. *Annals of Botany*, 95:99-110.

Dolezel, J., Greilhuber, J., Lucretti, S., Meister, A., Lysák, M., Nardi, L., Obermayer, R. (1998) Plant genome size estimation by flow cytometry: inter-laboratory comparison. *Annals of Botany*, 82:17-26.

Dressler, R.L. (1993) Phylogeny and classification of the orchid family. *Dioscorides Press, Portland Oregon*, 316p.

Dumet, D., Benson, E.E. (2000) The use of physical and biochemical studies to elucidate and reduced cryopreservation-induced damage in hydrated/desiccated plant germplasm. In: *Cryopreservation of tropical plant germplasm* (Edited by Engelmann, F. and Takagi, H.). Italy, IPGRI.

Engelmann, F. (1997) Importance of desiccation for the cryopreservation of recalcitrant seed and vegetatively propagated species. *Plant Genetic Resources*, 112:9-18.

- Engelmann, F. (2004) Plant cryopreservation: progress and prospects. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 40:427-433.
- Engelmann, F. (2011) Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 47:17-25.
- Engelmann, F., Gonzalez-Arno, M.T., Wu, Y., Escobar, R. (2008) The development of encapsulation dehydration. In: Reed, B.M. (ed.) *Plant cryopreservation: a practical guide*. Springer, New York, p.3-13.
- Ferreira, D.F. (2011) Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*, 35(6):1039-1042.
- Forni-Martins, E.R., Moraes, A.P., Costa, J.Y., Maekawa. (2013) Evolução cariotípica em Orchidaceae. In: *Anais do 30º encontro sobre temas de genética e melhoramento*. Piracicaba - SP, p.25-31.
- Fukai, S., Hasegawa, A., Goi, M. (2002) Polysomaty in *Cymbidium*. *HortScience*, 37:1088-1091.
- Galbraith, D.W., Lambert, G.M., Macas, J., Dolezel, J. (2001) Analysis of nuclear DNA content and ploidy in higher plants. *Current Protocols in Cytometry*, 7-6.
- Galdiano, R.F.Jr., Lemos, E.G.M., Faria, R.T., Vendrame, W.A. (2014). Seedling development and evaluation of genetic stability of cryopreserved *Dendrobium* hybrid mature seeds. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172(5):2521-2529.
- Galdiano, R.F.Jr., Lemos, E.G.M., Faria, R.T., Vendrame, W.A. (2012) Cryopreservation of *Dendrobium* hybrid seeds and protocorms as affected by phloroglucinol and Supercool X1000. *Scientia Horticulturae*, 148:154-160.
- Galdiano, R.F.Jr., Lemos, E.G.M., Vendrame, W.A. (2013) Cryopreservation, early seedling development, and genetic stability of *Oncidium flexuosum* Sims. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 114:139-148.
- Galdiano, R.F.Jr., Vendrame, W.A., Moretto, C., Faria, R.T., Lemos, E.G.M. (2017) Seed cryopreservation, *in vitro* propagation and *ex vitro* growth of *Cattleya walkeriana* Gardner, a vulnerable ornamental orchid. *Australian Journal of Crop Science*, 11:485-490.

- Givnish, T.J., Spalink, D., Ames, M., Lyon, S.P., Hunter, S.J., Zuluaga, A., Iles, W.J.D., Clements, M.A., Arroyo, M.T.K., Leebens-Mack, J., Endara, L., Kriebel, R., Neubig, K.M., Whitten, W.M., Williams, N.H., Cameron, K.M. (2015) Orchid phylogenomics and multiple drivers of their extraordinary diversification. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282:20151553.
- Gutiérrez, R.M.P. (2010) Orchids: a review of uses in traditional medicine, its phytochemistry and pharmacology. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4:592-638.
- Harding, K. (2004) Genetic integrity of cryopreserved plant cells: a review. *Cryo-Letters*, 25:3-22.
- Hay, F.R., Merritt, D.J., Soanes, J.A., Dixon, K.W. (2010) Comparative longevity of Australian orchid (Orchidaceae) seeds under experimental and low temperature storage conditions. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 164:26-41.
- Hirano, T., Godo, T., Mii, M., Ishikawa, K. (2005a) Cryopreservation of immature seeds of *Bletilla striata* by vitrification. *Plant Cell Reports*, 23:534-539.
- Hirano, T., Ishikawa, K., Mii, M. (2005b) Cryopreservation of immature seeds of *Ponerorchis graminifolia* var. *suzukiana* by vitrification. *CryoLetters*, 26:139-146.
- Hosomi, S.T., Custódio, C.C., Seaton, P.T., Marks, T.R., Machado-Neto, N.B. (2012) Improved assessment of viability and germination of *Cattleya* (Orchidaceae) seeds following storage. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 48:127-136.
- Huylensbroeck, J.M. Van, Piqueras, A., Debergh, P.C. (1998) Photosynthesis and carbon metabolism in leaves formed prior and during *ex vitro* acclimatization of micropropagated plants. *Plant Science*, 134:21-30.
- Ishikawa, K., Harata, K., Mii, M., Sakai, A., Yoshimatsu, K., Shimomura, K. (1997) Cryopreservation of zygotic embryos of a Japanese terrestrial orchid (*Bletilla striata*) by vitrification. *Plant Cell Reports*, 16:754-757.

- Jalal, J.S., Kumar, P., Tewari, L., Pangtey, Y.P.S. (2010) Orchids uses in traditional medicine in India. *Proceedings of National Seminar on Medicinal Plants of Himalaya: Potential and Prospect*. India, p.128-136.
- Jiang, C.D., Shi L., Gao, H.Y., Schansker, G., Tóth, S.Z., Strasser, R.J. (2006) Development of photosystems 2 and 1 during leaf growth in grapevine seedlings probed by chlorophyll a fluorescence transient and 820 nm transmission *in vivo*. *Photosynthetica*, 44:454-463.
- Kämpf, A.N. (1997) A floricultura brasileira em números. *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental*, 3(1/2):1-7.
- Kandavel, D., Aiyavu, C., Senthilkumar, S. (2004) Conservation of orchids - a problem oriented approach. In: BRITTO, S.J. (Ed.), *Orchids: Biodiversity and Conservation - A Tissue Culture Approach*. INR, St Joseph's college, India, Tiruchirappalli, p.1-16.
- Kaviani, B. (2011) Conservation of plant genetic resources by cryopreservation. *Australian Journal of Crop Science*, 5:778-800.
- Khoddamzadeh, A.A., Sinniah, U.R., Kadir, M.A., Kadzimin, S.B., Mahmood, M., Subramaniam, S. (2010) Detection of somaclonal variation by random amplified polymorphic DNA analysis during micropropagation of *Phalaenopsis bellina* (Rchb.f.) Christenson. *African Journal of Biotechnology*, 9:6632-6639.
- Kim, H.J., Lee, S.R., Moon, K.D. (2003) Ether fraction of methanol extracts of *Gastrodia elata*, medicinal herb protects against neuronal cell damage after transient global ischemia in gerbils. *Phytotherapy Research*, 17:909-912.
- Kolanowska, M. (2015) *Habenaria fimbriatiloba* (Orchidaceae), a new orchid species from China. *Physiologist*, 201:96-99.
- Kolomeitseva, G., Antipina, V., Nikishina, T., Popov, A., Shirokov, A. (2011) Passport data of orchid seeds in cryobank. *Proceedings of the 4th International Orchid Conservation Congress*. Czech Republic, p.80.
- Kostman, T.A., Tarlyn, N.M., Loewus, F.A., Franceschi, V.R. (2001) Biosynthesis of L-ascorbic acid and conversion of carbons 1 and 2 of L-ascorbic acid to

- oxalic acid occurs within individual calcium oxalate crystal idioblasts. *Plant Physiology*, 125:634-640.
- Kulus, D., Zalewska, M. (2014) Cryopreservation as a tool used in long-term storage of ornamental species-a review. *Scientia Horticulturae*, 168:88-107.
- Lee, H.O., Davidson, J.M., Duronio, R.J. (2009) Endoreplication: polyploidy with purpose. *Genes & Development*, 23:2461-2477.
- Leitch, I.J., Johnston, E., Pellicer, J., Hidalgo, O., Bennett, M.D. (2019) Angiosperm DNA C-values database (release 9.0, Apr 2019) <https://cvalues.science.kew.org/>
- Leitch, I.J., Kahandawala, I., Suda, J., Hanson, L., Ingrouille, M.J., Chase, M.W., Fay, M.F. (2009) Genome size diversity in orchids: consequences and evolution. *Annals of Botany*, 104:469-81.
- Lepers-Andrzejewski, S., Siljak-Yakovlev, S., Brown, S.C., Wong, M., Dron, M. (2011) Diversity and dynamics of plant genome size: An example of polysomaty from a cytogenetic study of *Tahitian vanilla* (*Vanillaxtahitensis*, Orchidaceae). *American Journal of Botany*, 98:986-997.
- Li, D.Z., Pritchard, H.W. (2009) The science and economics of *ex situ* plant conservation. *Trends in Plant Science*, 14:614-621.
- Li, Y., Li, F., Gong, Q., Wu, Q., Shi, J. (2011) Inhibitory effects of *Dendrobium* alkaloids on memory impairment induced by lipopolysaccharide in rats. *Planta Medica*, 77:117-121.
- Li-Cor. LI-3100. (1996) *Area meter instruction manual*. Lincoln, 34p.
- Lim, W.L., Loh, C.S. (2003) Endopolyploidy in *Vanda* Miss Joaquim (Orchidaceae). *New Phytologist*, 159:279-287.
- Liu, H., Luo, Y.B., Heinen, J., Bhat, M., Liu, Z.J. (2014) Eat your orchid and have it too: a potentially new conservation formula for Chinese epiphytic medicinal orchids. *Biodiversity and Conservation*, 23:1215-1228.

- Loureiro, J., Rodriguez, E., Dolezel, J., Santos, C. (2007) Two New Nuclear Isolation Buffers for Plant DNA Flow Cytometry: A Test with 37 Species. *Annals of Botany*, 100(4):875-888.
- Martin, K.P., Madassery, J. (2006) Rapid *in vitro* propagation of *Dendrobium* hybrids through direct shoot formation from foliar explants, and protocorm-like bodies. *Scientia Horticulturae*, 108:95-99.
- Martinelli, G., Moraes, M.A. (2013) Livro Vermelho da Flora do Brasil. Rio de Janeiro: Andrea Jacobson. 1062p.
- Massonnet, C., Tisné, S., Radziejwoski, A., Vile, D., De Veylder, L., Dauzat, M., Granier, C. (2011) New insights into the control of endoreduplication: endoreduplication could be driven by organ growth in *Arabidopsis* leaves. *Plant Physiology*, 157:2044-2055.
- Mayer, J.L.S., Ribas, L.L.F., Bona, C., Quoirin, M. (2008) Anatomia comparada das folhas e raízes de *Cymbidium* Hort. (Orchidaceae) cultivadas *ex vitro* e *in vitro*. *Acta Botanica Brasilica*, 22(2):323-332.
- Menezes, L.C. (2014) *Orchids: Brazilian central plateau*. Ibama, Brasília, 226.
- Merritt, D.J., Hay, F.R., Swarts, N.D., Sommerville, K.D., Dixon, K.W. (2014) *Ex situ* conservation and cryopreservation of orchid germplasm. *International Journal of Plant Sciences*, 175:46-58.
- Morita, H., Koyama, K., Sugimoto, Y., Kobayashi, J. (2005) Antimitotic activity and reversal of breast cancer resistance protein-mediated drug resistance by stilbenoids from *Bletilla striata*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 15:1051-1054.
- Murashige, T., Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15:473-497.
- Ng, T.B., Liu, J., Wong, J.H., Ye, X.J., Wing Sze, S.C., Tong, Y., Zhang, K.Y. (2012) Review of research on *Dendrobium*, a prized folk medicine. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93:1795-1803.

- Nikishina, T.V., Popov, A.S., Kolomeitseva, G.L., Golovkin, B.N. (2001) Effects of cryopreservation on seed germination of rare tropical orchids. *Russian Journal of Plant Physiology*, 48:810-815.
- Nikishina, T.V., Popova, E.V., Vakhrameeva, M.G., Varlygina, T.I., Kolomeitseva, G.L., Burov, A.V., Popovich, E.A., Shirokov, A.I., Shumilov, V.Yu., Popov, A.S. (2007) Cryopreservation of seeds and protocorms of rare temperate orchids. *Russian Journal of Plant Physiology*, 54:121-127.
- Nishizawa, S., Sakai, A., Amano, A.Y., Matsuzawa, T. (1993) Cryopreservation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) embryogenic suspension cells and subsequent plant regeneration by vitrification. *Plant Science*, 91:67-73.
- Paek, K.Y., Murthy, H.N. (2002) Temperate Oriental *Cymbidium* species. In: Kull, T., Arditti, J. (Eds.), *Orchid Biology Reviews and Perspectives, VIII*. Springer, Netherlands, p.235-286.
- Panis, B., Lambardi, M. (2006) Status of cryopreservation technologies in plants (crops and forest trees). In: Ruane, J.; Sonnino, A. (Ed.). *The role of biotechnology in exploring and protecting agricultural genetic resources*. Rome: FAO, p.61-78.
- Pant, B. (2013) Medicinal orchids and their uses: tissue culture a potential alternative for conservation. *African Journal of Plant Science*, 7:448-467.
- Pardo, V.A., Ferreira, A.G. (2006) Armazenamento de sementes de orquídeas. *Revista Brasileira de Sementes*, 28(2):92-98.
- Peredo, E.L., Arroyo-García, R., Reed, B.M., Revilla, M.A. (2008) Genetic and epigenetic stability of cryopreserved and cold-stored hops (*Humulus lupulus* L.). *Cryobiology*, 57:234-241.
- Pinto, G., Louveiro, T., Santos, C. (2004) Analysis of the genetic stability of *Eucalyptus globulus* Labill. somatic embryos by flow cytometry. *Theoretical and Applied Genetics*, 109:580-587.
- Popova, E., Kim, H.H., Saxena, P.K., Engelmann, F., Pritchard, H.W. (2016) Frozen beauty: The cryobiotechnology of orchid diversity. *Biotechnology Advances*, 34(4):380-403.

- Popova, E.V., Kima, H., Paek, H. (2010) Cryopreservation of coriander (*Coriandrum sativum* L.) somatic embryos using sucrose preculture and air desiccation. *Scientia Horticulturae*, 124:522-528.
- Popova, E.V., Lee, E., Wu, C., Hahn, E., Paek, K. (2009) A simple method for cryopreservation of *Ginkgo biloba* callus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 97:337-343.
- Popova, E.V., Nikishina, T.V., Kolomeitseva, G.L., Popov, A.S. (2003) The effect of seed cryopreservation on the development of protocorms by the hybrid orchid *Bratonia*. *Russian Journal of Plant Physiology*, 50:672-677.
- Prado, M.J., Rodriguez, E., Rey, L., Gozalez, M.V., Santos, C., Rey, M. (2010) Detection of somaclonal variants in somatic embryogenesis regenerated plants of *Vitis vinifera* by flow cytometry and microsatellite markers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 102:49-59.
- Pridgeon, A., Morrison, A. (2005) *The illustrated encyclopedia of orchids: over 1100 species illustrated and identified*, v.1. Timber Press, Portland.
- Pritchard, H.W. (1984) Liquid nitrogen preservation of terrestrial and epiphytic orchid seeds. *CryoLetters*, 5:295-300.
- Pritchard, H.W. (2007) Cryopreservation of desiccation-tolerant seeds. In: Day, J.G., Stacey, G.N. (Eds.), *Methods in Molecular Biology. Vol 368. Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols, second ed. Humana Press Inc, Totowa, New Jersey*, p.185-201.
- Pritchard, H.W., Dickie, J.B. (2003) Predicting seed longevity: use and abuse of seed viability equations. In: Smith, R.D., Dickie, J.B., Linington, S.H., Pritchard, H.W., Probert, R.J. (Eds.), *Seed Conservation: Turning Science into Practice*. Royal Botanic Gardens Kew, UK, p.653-722.
- Pritchard, H.W., Poynter, A.L.C., Seaton, P.T. (1999) Interspecific variation in orchid seed longevity in relation to ultra-dry storage and cryopreservation. *Lindleyana*, 14(2):92-101.

- Pritchard, H.W., Seaton, P.T. (1993) Orchid seed storage: historical perspective, current status, and future prospects for long-term conservation. *Selbyana*, 14:89-104.
- Rupp, B., Samuel, R., Russell, A., Temsch, E.M., Chase, M.W., Leitch, I.J. (2010) Genome size in *Polystachya* (Orchidaceae) and its relationships to epidermal characters. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 163:223-233.
- Sakai, A., Engelmann, F. (2007) Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet vitrification: a review. *Cryo-Letters*, 28:151-172.
- Sakai, A., Hirai, D., Niino, T. (2008) Development of PVS-based vitification and encapsulation-vitrification protocols. In: Reed, B. (ed.) *Plant cryopreservation: a practical guide*. New York: Springer, p.33-58.
- Sakai, A., Kobayashi, S., Oiyama, I. (1990) Cryopreservation of nucellar cells of navel Orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. *Plant Cell Reports*, 9:30-3.
- Sakai, A., Kobayashi, S., Oiyama, I. (1991) Survival by vitrification of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* var. *brasiliensis* Tanaka) cooled to -196°C. *Journal of Plant Physiology*, 137:465-470.
- Schuiteman, A. (2015) Discovering New Orchids. *Royal Botanical Gardens Kew Blog*. Disponível em: <http://www.kew.org/discover/blogs/kew-science/discovering-new-orchids>. Acesso em: 14 Jun. 2019.
- Seaton, P.T., Hu, H., Perner, H., Pritchard, H.W. (2010) *Ex situ* conservation of orchids in a warming world. *Botanical Review*, 76:193-203.
- Seaton, P.T., Pritchard, H.W. (2011) Orchid seed stores for sustainable use: a model for future seed-banking activities. *Lankesteriana*, 11:349-353.
- Shih, C.C., Wu, Y.W., Lin, W.C. (2002) Antihyperglycemic and antioxidant properties of *Anoectochilus formosanus* in diabetic rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 29:684-688.
- Singh, A., Duggal, S. (2009) Medicinal orchids: an overview. *Ethnobotanical Leaflets*, 13:351-363.

- Singh, F. (1999) Differential staining of orchid seeds for viability testing. *American Orchid Society Bulletin*, 50(4):416-418.
- Sopalun, K., Thammasiri, K., Ishikawa, K. (2010) Micropropagation of the thai orchid *Grammatophyllum speciosum* blume. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 101:143-150.
- Stirbet, A., Govindjee. (2011) On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll a fluorescence induction) and Photosystem II: Basics and applications of the OJIP fluorescence transient. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 104:236-257.
- Strauss, A.J., Kruger, G.H.J., Strasser, R.J., Van Heerden, P.D.R. (2006) Ranking of dark chilling tolerance in soybean genotypes probed by the chlorophyll a fluorescence transient O-J-I-P. *Environmental and Experimental Botany*, 56:147-157.
- Swarts, N.D., Dixon, K.W. (2009) Perspectives on orchid conservation in botanic gardens. *Trends in Plant Science*, 14:11.
- Teixeira da Silva, J.A. (2013a) Cryopreservation of hybrid *Cymbidium* protocorm-like bodies by encapsulation-dehydration and vitrification. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 49:690-698.
- Teixeira da Silva, J.A. (2013b) Orchids: advances in tissue culture, genetics, phytochemistry and transgenic biotechnology. *Floriculture and Ornamental Biotechnology*, 7:1-52.
- Teixeira da Silva, J.A., Zeng, S., Galdiano Jr., R.F., Dobránszki, J., Cardoso, J.C., Vendrame, W.A. (2014) *In vitro* conservation of *Dendrobium* germplasm. *Plant Cell Reports*, 33:1413-1423.
- US Department of Agriculture (2012) Floriculture crops 2011 summary. National Agricultural Statistics Service. Washington, DC. Disponível em: <http://usda.mannlib.cornell.edu/usda/nass/FlorCrop//2010s/2012/FlorCrop-05-31-2012.pdf>. Acesso em: 14 Mai. 2019.

- Vale, A., Pérez-Obregón, R.A., Faife-Cabrera, M., Álvarez, J.C., Rojas, D. (2014) A new orchid species from the keys of central Cuba and a checklist of Cuban *Encyclia* (Orchidaceae, Laeliinae). *Systematic Botany*, 39:1076-1082.
- Vendrame, W.A., Carvalho, V.S., Dias, J.M.M. (2007) *In vitro* germination and seedling development of cryopreserved *Dendrobium* hybrid mature seeds. *Scientia Horticulturae*, 114(3):188-193.
- Vendrame, W.A., Faria, R.T., Sorace, M., Sahyun, S.A. (2014) Orchid cryopreservation. *Ciência e Agrotecnologia*, 38(3):213-229.
- Vinogradova, T., Andronova, T. (2002) Development of orchid seeds and seedling. In: Kull, T., Arditti, J. (Eds.), *Orchid Biology: Reviews and Perspectives*. Kluwer Acad Publ, Dordrecht, p.167-234.
- Volkova, L.A., Urmantseva, V.V., Popova, E.V., Nosov, A.M. (2015) Physiological, cytological and biochemical stability of *Medicago sativa* L. cell culture after 27 years of cryogenic storage. *CryoLetters*, 36:252-263.
- Wang, B., Wang, R.R., Cui, Z.H., Bi, W.L., Li, J.W., Li, B.Q., Ozudogru, E.A., Volk, G.M., Wang, Q.C. (2014) Potential applications of cryogenic technologies to plant genetic improvement and pathogen eradication. *Biotechnology Advances*, 32:583-595.
- Wang, B., Zhang, Z., Yin, Z., Feng, C., Wang, Q. (2012) Novel and potential application of cryopreservation to plant genetic transformation. *Biotechnology Advances*, 30:604-612.
- Wang, Q., Valkonen, J.P.T. (2009) Cryotherapy of shoot tips: novel pathogen eradication method. *Trends in Plant Science*, 14:119-122.
- Wood, J.J. (1989) British orchids in their European context. In: Pritchard, H.W. (Ed.), *Modern Methods in Orchid Conservation: The Role of Physiology, Ecology and Management*. Cambridge University Press, UK, p.141-145.
- Wu, R.Y., Chang, S.Y., Hsieh, T.F., Chang, Y.S. (2013) Cryopreservation of *Bletilla formosana* seeds (Orchidaceae) by desiccation. *Scientia Horticulturae*, 157, 108–112.

- Yam, T.W., Arditti, J. (2009) History of orchid propagation: a mirror of the history of biotechnology. *Plant Biotechnology Reports*, 3:1-56.
- Yang, M., Loh, C.S. (2004) Systemic endopolyploidy in *Spathoglottis plicata* (Orchidaceae) development. *BMC Cell Biology*, 5:33.
- Zindler-Frank, E., Honow, R., Hesse, A. (2001) Calcium and oxalate content of the leaves of *Phaseolus vulgaris* at different calcium supply in relation to calcium oxalate crystal formation. *Journal of Plant Physiology*, 158:139-144.