

CRIOPRESERVAÇÃO DE SEMENTES DE *Cattleya guttata* E
Epidendrum denticulatum PELO MÉTODO DE DESIDRATAÇÃO EM
SÍLICA-GEL

OTALÍCIO DAMÁSIO DA COSTA JÚNIOR

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO - UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
FEVEREIRO - 2024

CRIOPRESERVAÇÃO DE SEMENTES DE *Cattleya guttata* E
Epidendrum denticulatum PELO MÉTODO DE DESIDRATAÇÃO EM
SÍLICA-GEL

OTALÍCIO DAMÁSIO DA COSTA JÚNIOR

“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.^a Virginia Silva Carvalho

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
FEVEREIRO - 2024

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pelo autor.

C837

Costa Junior, Otávio Damásio da.

Criopreservação de sementes de *Cattleya guttata* e *Epidendrum denticulatum* pelo método de desidratação em sílica-gel / Otávio Damásio da Costa Junior. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2024.

98 f. : il.

Bibliografia: 63 - 77.

Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2024.
Orientadora: Virginia Silva Carvalho.

1. Orchidaceae. 2. Conservação *ex situ*. 3. Nitrogênio líquido. 4. Microscopia eletrônica. 5. Reação em cadeia da polimerase. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 631.5233

CRIOPRESERVAÇÃO DE SEMENTES DE *Cattleya guttata* E
Epidendrum denticulatum PELO MÉTODO DE DESIDRATAÇÃO EM
SÍLICA-GEL

OTALÍCIO DAMÁSIO DA COSTA JÚNIOR

“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 8 de fevereiro de 2024.

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., Fitopatologia) – UENF



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

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por estar do meu lado durante toda a caminhada ao longo de todos esses anos de muito estudo.

Aos meus pais, Maria Solange Barbosa de Araújo Costa e Otacílio Damásio da Costa, pelo exemplo e por sempre me incentivarem, mostrando que o estudo é o melhor caminho a se seguir.

Aos meus irmãos, Bruno de Araújo Costa e Brena de Araújo Costa, pelo apoio e por acreditarem em mim.

Ao meu tio Bibiu, sua esposa Fátima, minha tia Paula e meus primos, Weidman e Vinícius.

A minha avó, dona Dora, pela satisfação e alegria em me ver estudando e me formando doutor.

À professora Virginia, que além de orientadora foi minha amiga. Agradeço imensamente pela orientação, pela amizade, pelos conselhos e pelos momentos de descontração. Agradeço a confiança e por me receber como seu orientado lá no mestrado. Sempre serei grato por essa oportunidade. Agradeço por compartilhar comigo todo o seu conhecimento e pela maneira como decidiu me orientar.

A todos os meus amigos e colegas de laboratório: Lidiane, Carlos, Kíssila, Isis, Gabriel, Larissa, Daniel, Clarissa, Pedro e Gabriela.

Em especial, agradeço ao Carlos, por todo o apoio e dedicação durante as avaliações dos experimentos, pela sua prestatividade e total comprometimento com as atividades, além de sua companhia, dos momentos de descontração, das suas

histórias e conselhos, dos quais, jamais esquecerei. Levarei você para o resto da vida. Agradeço por tudo!

Aos meus amigos da UENF, de Campos e da Ilha do Governador: Will, Thais, Ludy, Igor, Sheila, Renato, Louise, Baby, Giu, Yasmin, Cristina, Danilo, Samuel, Gerbasi, Ramon, Lázaro, Elon, Pedro, Israel, Dora, Gustavo, Alexandra e Wanderson, Ana, Juliana, Valdinei e Jocarla, por terem me proporcionado momentos únicos e felizes.

Aos meus amigos 'Importantes' lá da Paraíba: Cleide, Pricilla, Rosângela, Leiliane, Mércia e Sônia, por todo o apoio e por estarem sempre presentes na minha vida, mesmo distantes.

À professora Núbia, que durante a graduação, apresentou-me a cultura de tecidos vegetais, permitindo que eu pudesse trilhar os caminhos que hoje me trouxeram até aqui.

A todos os professores que me acompanharam durante a graduação na UFPB, e aos professores da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, por todo conhecimento transmitido.

A todos os servidores e técnicos administrativos que compõem a Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Em especial, ao secretário Daniel, do Programa de Genética e Melhoramento de Plantas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001, pelo financiamento da minha bolsa de estudo. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro pela oportunidade de poder concretizar mais um sonho.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Aspecto morfológico das cápsulas (A e B) e das sementes coradas com tetrazólio (C e D) de *C. guttata* e *E. denticulatum*, respectivamente, utilizadas nos experimentos..... 16
- Figura 2.** Fluxograma dos procedimentos de montagem dos experimentos de viabilidade pelo teste de tetrazólio e germinação *in vitro* após a aplicação do método de criopreservação de sementes de *C. guttata* e *E. denticulatum* por meio da desidratação em sílica-gel (SG)..... 19
- Figura 3.** Qualidade do DNA extraído de *C. guttata* T1: 0h (Controle 1), T2: 0h + NL (Controle 2) e T12: 30 dias na sílica-gel + NL e *E. denticulatum* T1: 0h (Controle 1), T2: 0h + NL (Controle 2) e T4: 30 dias na sílica-gel + NL (G, H e I). DNA controle (C).....24
- Figura 4.** Viabilidade das sementes de *C. guttata* coradas com 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio (TTC). T1: 0h (Controle 1) (A), T2: 0h + NL (Controle 2) (B), T3: 24h na sílica-gel (Controle 3) (C), T4: 24h na sílica-gel + NL (D), T5: 48h na sílica-gel (Controle 4) (E), T6: 48h na sílica-gel + NL (F), T7: 72h na sílica-gel (Controle 5) (G), T8: 72h na sílica-gel + NL (H), T9: 96h na sílica-gel (Controle 6) (I), T10: 96h na sílica-gel + NL (J), T11: 30 dias na sílica-gel (Controle 7) (K) e T12: 30 dias na sílica-gel + NL (L). (M): Semente viável (vi) e sementes inviáveis (in).29

Figura 5. Germinação das sementes de *C. guttata* após 90 dias de semeio *in vitro*. T1: 0h (Controle 1) (A), T2: 0h + NL (Controle 2) (B), T3: 24h na sílica-gel (Controle 3) (C), T4: 24h na sílica-gel + NL (D), T5: 48h na sílica-gel (Controle 4) (E), T6: 48h na sílica-gel + NL (F), T7: 72h na sílica-gel (Controle 5) (G), T8: 72h na sílica-gel + NL (H), T9: 96h na sílica-gel (Controle 6) (I), T10: 96h na sílica-gel + NL (J), T11: 30 dias na sílica-gel (Controle 7) (K) e T12: 30 dias na sílica-gel + NL (L).30

Figura 6. Viabilidade das sementes de *E. denticulatum* coradas com 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio (TTC). T1: 0h (Controle 1) (A), T2: 0h + NL (Controle 2) (B), T3: 24h na sílica-gel (Controle 3) (C), T4: 24h na sílica-gel + NL (D), T5: 48h na sílica-gel (Controle 4) (E), T6: 48h na sílica-gel + NL (F), T7: 72h na sílica-gel (Controle 5) (G), T8: 72h na sílica-gel + NL (H), T9: 96h na sílica-gel (Controle 6) (I), T10: 96h na sílica-gel + NL (J), T11: 30 dias na sílica-gel (Controle 7) (K) e T12: 30 dias na sílica-gel + NL (L). (M): Sementes viáveis (vi) e sementes inviáveis (in).32

Figura 7. Germinação das sementes de *E. denticulatum* após 90 dias de semeio *in vitro*. T1: 0h (Controle 1) (A), T2: 0h + NL (Controle 2) (B), T3: 24h na sílica-gel (Controle 3) (C), T4: 24h na sílica-gel + NL (D), T5: 48h na sílica-gel (Controle 4) (E), T6: 48h na sílica-gel + NL (F), T7: 72h na sílica-gel (Controle 5) (G), T8: 72h na sílica-gel + NL (H), T9: 96h na sílica-gel (Controle 6) (I), T10: 96h na sílica-gel + NL (J), T11: 30 dias na sílica-gel (Controle 7) (K) e T12: 30 dias na sílica-gel + NL (L).33

Figura 8. Plantas de *C. guttata* obtidas um ano após o semeio *in vitro*.38

Figura 9. Plantas de *E. denticulatum* obtidas 10 meses após o semeio *in vitro*. ...39

Figura 10. Matriz bivariada - Correlação de Pearson entre características de sementes que foram expostas a sílica-gel e sílica-gel + NL e das plantas obtidas um ano após o semeio *in vitro*. Umidade das sementes (UMI), tempo de exposição das sementes a sílica-gel (TEM), viabilidade (VIA), germinação (GER), número de folhas (NF), área foliar (AF), volume radicular (VR), massa da matéria seca da raiz (MMSR), parte aérea (MMSPA) e total (MMST), índice fotossintético (PI), Fv/Fm (FVFM) e índice de verde (IV) de plantas de *C. guttata*. Vermelho e ajustes ($r = -$) representam correlação negativa e azul representa correlação positiva ao nível de significância $p < 0,05$43

Figura 11. Matriz bivariada - Correlação de Pearson entre características de sementes que foram expostas apenas a sílica-gel e sílica-gel + NL durante o cultivo <i>in vitro</i> . Umidade das sementes (UMI), tempo de exposição a sílica-gel (TEM), viabilidade (VI) e germinação (GER) de sementes de <i>E. denticulatum</i> . Vermelho e ajustes ($r = -$) representam correlação negativa e azul representa correlação positiva à significância $p < 0,05$	44
Figura 12. Microscopia Eletrônica de Varredura na face adaxial e abaxial de folhas de plantas de <i>C. guttata</i> após 10 meses de cultivo <i>in vitro</i> . T1: 0h (Controle 1) (A, B e C), T2: 0h + NL (Controle 2) (D, E e F) e T12: 30 dias na sílica-gel + NL (G, H e I). As setas apontam as regiões em que houve ruptura da cutícula na face adaxial da folha.	48
Figura 13. Microscopia Eletrônica de Varredura na face adaxial e abaxial de folhas de plantas de <i>E. denticulatum</i> após 10 meses de cultivo <i>in vitro</i> . T1: 0h (Controle 1) (A, B e C), T2: 0h + NL (Controle 2) (D, E e F) e T12: 30 dias na sílica-gel + NL (G, H e I). As setas apontam os estômatos malformados (G e H) e danos causados à cutícula (I).	49
Figura 14. Determinação da estabilidade genética com o uso de cinco marcadores (M) ISSR em plantas de <i>C. guttata</i> , após a criopreservação de suas sementes nos seguintes tratamentos: T1: 0h (Controle 1), T2: 0h + NL (Controle 2) e T12: 30 dias na sílica-gel + NL).	50
Figura 15. Determinação da estabilidade genética com o uso de cinco marcadores (M) ISSR em plantas de <i>E. denticulatum</i> , após a criopreservação de suas sementes nos seguintes tratamentos: T1: 0h (Controle 1), T2: 0h + NL (Controle 2) e T4: 24h na sílica-gel + NL.	50
Figura 16. Plantas de <i>C. guttata</i> obtidas <i>in vitro</i> após sete meses de aclimatização.	55
Figura 17. Plantas de <i>E. denticulatum</i> obtidas <i>in vitro</i> após sete meses de aclimatização.	59
Figura 18. Matriz bivariada - Correlação de Pearson entre características de plantas após sete meses de aclimatização, provenientes de sementes que foram	

expostas a sílica-gel e sílica-gel + NL. Umidade das sementes (UMI), tempo de exposição das sementes a sílica-gel (TEM), viabilidade (VI), germinação (GER), número de folhas (NF), área foliar (AF), volume radicular (VR), massa da matéria seca da raiz (MMSR), parte aérea (MMSPA) e total (MMST), índice fotossintético (PI), Fv/Fm (FVFM) e índice de verde (IV) de plantas de *C. guttata*. Vermelho e ajustes (r= -) representam correlação negativa e azul representa correlação positiva ao nível de significância $p < 0,05$61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características biométricas e fisiológicas das cápsulas e das sementes de <i>C. guttata</i> e <i>E. denticulatum</i> utilizadas nos experimentos.	16
Tabela 2. Tratamentos utilizados no experimento de criopreservação de sementes de <i>C. guttata</i> e <i>E. denticulatum</i>	17
Tabela 3. Primers utilizados para a análise via PCR.	25
Tabela 4. Viabilidade (%) de sementes de <i>C. guttata</i> coradas com 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio (TTC), umidade das sementes (%) e germinação (%) das sementes criopreservadas em NL ao longo de 30 dias em diferentes tempos.	28
Tabela 5. Viabilidade (%) de sementes de <i>E. denticulatum</i> coradas com 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio (TTC), umidade das sementes (%) e germinação (%) das sementes criopreservadas em NL ao longo de 30 dias em diferentes tempos.	31
Tabela 6. Número de folhas (NF), volume radicular (VR), área foliar (AF), massa da matéria seca da parte aérea (MMSPA), massa da matéria seca da raiz (MMSR) e massa da matéria seca total (MMST) de plantas de <i>C. guttata</i> provenientes de sementes criopreservadas após um ano de cultivo <i>in vitro</i>	37
Tabela 7. Número de folhas (NF) de plantas de <i>E. denticulatum</i> provenientes de sementes criopreservadas após 10 meses de cultivo <i>in vitro</i>	39

Tabela 8. Relação Fv/Fm e índice fotossintético (PI) de plantas de <i>E. denticulatum</i> provenientes de sementes criopreservadas após 10 meses de cultivo <i>in vitro</i>	41
Tabela 9. Área foliar (AF), massa da matéria seca da parte aérea (MMSPA) e massa da matéria seca total (MMST) de plantas de <i>C. guttata</i> provenientes de sementes criopreservadas após sete meses de aclimatização das plantas	54
Tabela 10. Número de folhas (NF), volume radicular (VR), área foliar (AF), massa da matéria seca da parte aérea (MMSPA), massa da matéria seca da raiz (MMSR) e massa da matéria seca total (MMST) de plantas de <i>E. denticulatum</i> provenientes de sementes criopreservadas após sete meses de aclimatização.....	56
Tabela 11. Relação Fv/Fm de plantas de <i>C. guttata</i> provenientes de sementes criopreservadas após sete meses de aclimatização.	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCTA - Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias.

CV (%) - Coeficiente de variação.

DBC - Delineamento em blocos ao acaso.

DIC - Delineamento inteiramente ao acaso.

ISSR - *Inter Simple Sequence Repeats*.

LFIT - Laboratório de Fitotecnia.

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

MS – Meio de cultura Murashige e Skoog.

NaClO - Hipoclorito de sódio.

NL - Nitrogênio líquido.

PCR - Reação em cadeia da polimerase.

pH - Potencial hidrogeniônico.

PI - Índice fotossintético.

PLBs - Protocorm-like bodies.

UENF - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

SUMÁRIO

RESUMO	xiii
ABSTRACT	xv
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
2.1. Geral	4
2.2. Específicos.....	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1. Família Orchidaceae: origem e aspectos botânicos.....	5
3.2. Importância econômica da família Orchidaceae	7
3.3. Desafios e estratégias para a conservação de espécies da família Orchidaceae.....	8
3.4. Criopreservação de sementes de orquídeas.....	10
3.5. Criopreservação pelo método de desidratação em sílica-gel.....	12
3.6. Estabilidade genética na criopreservação de orquídeas: Marcadores moleculares.....	13
4. MATERIAL E MÉTODOS	15
4.1. Germoplasma.....	15
4.1.1. Caracterização das cápsulas e sementes.....	15
4.1.2. Criopreservação das sementes de <i>C. guttata</i> e <i>E. denticulatum</i>	17
4.1.3. Teste de viabilidade das sementes criopreservadas.....	20
4.1.4. Teste de germinação <i>in vitro</i> das sementes criopreservadas	20
4.1.5. Crescimento <i>in vitro</i> das plântulas	20
4.1.6. Aclimatização	21
4.1.6.1. ANÁLISES	21

4.1.6.2. Determinação da área foliar	22
4.1.6.3. Determinação do volume radicular	22
4.1.6.4. Análises fisiológicas	22
4.1.6.5. Determinação da massa da matéria seca	22
4.1.6.6. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	23
4.1.6.7. Isolamento de DNA genômico e análise molecular via PCR	23
4.1.6.8. Análise estatística	25
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
5.1. Cultivo <i>in vitro</i>	26
5.1.1. Viabilidade e germinação das sementes.....	26
5.1.2. Crescimento <i>in vitro</i>	35
5.1.2.1. Análises biométricas	35
5.1.2.2. Análises fisiológicas	40
5.1.2.3. Análise de correlação.....	41
5.1.2.4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	44
5.1.2.5. Estabilidade genética das plantas.....	49
5.1.3. Aclimatização das plantas.....	52
5.1.3.1. Análises biométricas	52
5.1.3.2. Análises fisiológicas	57
5.1.3.3. Análise de correlação.....	59
6. CONCLUSÕES	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63
APÊNDICE.....	78

RESUMO

COSTA JÚNIOR, Otávio Damásio; D.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Fevereiro, 2024; Criopreservação de sementes de *Cattleya guttata* e *Epidendrum denticulatum* pelo método de desidratação em sílica-gel; Orientadora: Prof.^a Virginia Silva Carvalho; Conselheiras: Prof.^a Claudete Santa Catarina e Prof.^a Telma Nair Santana Pereira.

As orquídeas pertencem a família Orchidaceae, sendo esta considerada como uma das mais diversificadas e taxonomicamente complexas dentre as angiospermas. Devido a grande perda de recursos genéticos pertencentes a essa família, cada vez mais torna-se necessário o uso de métodos para a sua conservação. Um dos métodos mais estudados atualmente é a conservação *ex situ* por meio da criopreservação. Porém, a principal limitação para a criopreservação de sementes de orquídeas está na resposta específica dos diferentes genótipos aos protocolos de criopreservação que, às vezes, são caros e necessitam de mão de obra especializada, o que acaba dificultando o desenvolvimento de um protocolo de criopreservação de caráter universal. Com isso, o objetivo deste trabalho foi estudar a eficiência da desidratação em sílica-gel na criopreservação de sementes de *Cattleya guttata* e *Epidendrum denticulatum* com alta umidade. Para cada espécie, o experimento foi conduzido em DIC, com 12 tratamentos e cinco repetições, sendo: diferentes tempos de desidratação das sementes em sílica-gel + NL (0h, 24h, 48h, 72h, 96h e 30 dias), cada um dos tratamentos possuiu um respectivo controle sem exposição das sementes ao NL. Após a criopreservação, foram avaliadas a viabilidade das sementes, germinação e crescimento das plântulas *in*

vitro e das plantas após a aclimatização. Foram avaliadas variáveis biométricas (número de folhas, área foliar, volume radicular e massa da matéria seca da raiz, parte aérea e total), fisiológicas (índice fotossintético, Fv/Fm e índice de verde), de microscopia (Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV), análise de correlação e de estabilidade genética por meio de primers ISSR. O tratamento controle de *C. guttata* com umidade inicial de 56,90% apresentou maior viabilidade (95,72%) e germinação (92,43%) das sementes quando expostas diretamente ao NL. Já para *E. denticulatum*, sementes com umidade inicial de 70,57%, o tratamento controle resultou em maior viabilidade (85,94%) e germinação (49,36%), com redução da viabilidade e germinação em ambas as espécies à medida que são desidratadas. As plantas obtidas *in vitro* apresentaram características fenotípicas de plantas normais. Alterações microestruturais das folhas de ambas as espécies cultivadas *in vitro*, não comprometeram a aclimatização das plantas. Análises de correlação indicam que durante o cultivo *in vitro* e aclimatização, a presença ou ausência do NL e fatores como umidade da semente e tempo de exposição das sementes a sílica-gel, apresentam correlação com variáveis biométricas e fisiológicas, interferindo no desenvolvimento das mudas. Como conclusão, sementes de *C. guttata* com umidade entre 41,93% e 56,90% podem ser imersas diretamente em NL sem a necessidade de desidratação em sílica-gel. Sementes de *E. denticulatum* não toleram a desidratação em sílica-gel seguida da criopreservação em NL. Dessa forma, outras técnicas de criopreservação devem ser utilizadas para investigar a conservação dessa espécie.

Palavras-chave: Orchidaceae; conservação *ex situ*; nitrogênio líquido; microscopia eletrônica; reação em cadeia da polimerase.

ABSTRACT

COSTA JÚNIOR, Otacílio Damásio; D.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; February, 2024; Cryopreservation of *Cattleya guttata* and *Epidendrum denticulatum* seeds by the desiccation method using silica gel; Advisor: Prof.^a Virginia Silva Carvalho; Committee members: Prof.^a Claudete Santa Catarina e Prof.^a Telma Nair Santana Pereira.

Orchids belong to the Orchidaceae family, considered one of the most diverse and taxonomically complex among the angiosperms. Due to the great loss of genetic resources belonging to this family, it is increasingly necessary to use methods for their conservation. One of the most studied methods currently is *ex situ* conservation through cryopreservation. However, the main limitation of the cryopreservation of orchid seeds is the specific response of different genotypes to cryopreservation protocols, which are often expensive and require specialized labor, making it challenging to develop a specific cryopreservation protocol universally. Therefore, the objective of this work was to study the efficiency of dehydration in silica gel in the cryopreservation of *Cattleya guttata* and *Epidendrum denticulatum* seeds with high humidity. For each species, the experiment was conducted in completely random design (CRD), with 12 treatments and five replications, being: different dehydration times of seeds in silica gel + LN (0h, 24h, 48h, 72h, 96h and 30 days), each of the treatments had a respective control without exposure of seeds to LN. After cryopreservation, seed viability, germination and growth of seedlings *in vitro* and plants after acclimatization were evaluated. Biometric variables (number of leaves, leaf area, root volume and dry matter mass of the root, aerial part and total),

physiological (photosynthetic index, Fv/Fm and green index), microscopy (Scanning Electron Microscopy - SEM), correlation and genetic stability analysis using ISSR primers via PCR. The control treatment of *C. guttata* with an initial humidity of 56.90% showed greater viability (95.72%) and germination (92.43%) of the seeds when directly exposed to LN. For *E. denticulatum*, seeds with an initial humidity of 70.57%, the control treatment resulted in greater viability (85.94%) and germination (49.36%), with a reduction in viability and germination in both species as they are dehydrated. However, the plants obtained *in vitro* showed phenotypic characteristics of typical plants. Microstructural changes in the leaves of both species grown *in vitro* did not compromise the acclimatization of the plants. Correlation analyzes indicate that during *in vitro* cultivation and acclimatization, the presence or absence of NL and factors such as seed moisture and seed exposure time to silica gel correlate with biometric and physiological variables, interfering with seedling development. In conclusion, *C. guttata* seeds with moisture between 41.93% and 56.90% can be immersed directly in LN without the need for dehydration in silica gel. *E. denticulatum* seeds do not tolerate dehydration in silica gel followed by cryopreservation in LN, therefore, other cryopreservation techniques must be used to investigate the conservation of this species.

Key-words: Orchidaceae; *ex situ* conservation; liquid nitrogen; electron microscopy; polymerase chain reaction.

1. INTRODUÇÃO

A família Orchidaceae possui cerca de 28.000 espécies divididas em cinco subfamílias, sendo considerada uma das maiores e mais distribuídas famílias de plantas com flores, as quais, representam cerca de 8% da diversidade de espécies de angiospermas em todo o planeta (Chase et al., 2015).

A grande diversidade de orquídeas está associada a diversos habitats, podendo ocorrer em locais de clima temperado ou mesmo ocupando as grandes florestas tropicais. Tal diversidade pode ser atribuída a sua capacidade de crescer no solo, em forófitos e sobre as rochas (Wraith e Pickering, 2019). Enquanto a maioria das orquídeas de clima temperado são terrícolas, naquelas tropicais predominam as espécies epífitas e as rupícolas (Givnish et al., 2015). No entanto, apesar do sucesso adaptativo das orquídeas ao longo do processo evolutivo, as orquídeas pertencem a um dos grupos taxonômicos mais ameaçados do mundo (Wraith e Pickering, 2019).

O Brasil é considerado um dos países com maior diversidade de orquídeas, com cerca de 252 gêneros e 2.807 espécies; dessas, 56% das espécies são consideradas endêmicas (Barros et al., 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, um significativo número de espécies de orquídeas corre sério risco de extinção, dentre elas, uma das espécies em estudo, a *Cattleya guttata*.

Em consequência das limitações relacionadas aos métodos convencionais de conservação de germoplasma *ex situ* e *in situ*, tecnologias alternativas como a conservação *in vitro* têm sido desenvolvidas e aprimoradas. Tais alternativas são consideradas estratégicas para a conservação de recursos genéticos vegetais (Radzan, 2003).

A criopreservação é um método de conservação de germoplasma *ex situ* já utilizado em diversas espécies vegetais, incluindo espécies ornamentais e ameaçadas de extinção (Gowthami et al., 2023; Popova et al., 2023; Bettoni et al., 2024). A criopreservação é atualmente a abordagem biotecnológica mais inovadora e acessível que permite a conservação segura a longo prazo da biodiversidade vegetal, sem risco de modificações genéticas (Benelli, 2021). Por meio dos bancos criogênicos, a criopreservação permite o armazenamento de materiais biológicos por tempo indefinido, com baixos riscos de perda do material conservado, uma vez que o metabolismo celular é tão reduzido que a deterioração biológica é praticamente paralisada (Engelmann et al., 2008)

Além de manter a estabilidade genética, comprovada por meio da citometria de fluxo, em estudo realizado com diversas espécies do gênero *Cattleya*, foi comprovado que as características fisiológicas e anatômicas também são preservadas após a criopreservação das sementes e aclimatização das plantas obtidas *in vitro* (Vettorazzi et al., 2019). Técnicas moleculares têm sido utilizadas para avaliar a estabilidade genética em orquídeas que já foram criopreservadas e micropropagadas, por meio do uso de marcadores moleculares como o RAPD e ISSR (Worrachottayanon e Bunnag, 2018; Jariyajirawattana e Bunnag, 2020; Khor et al., 2020; Tikendra et al., 2021; Joshi et al., 2023; Pradhan et al., 2023).

São diversos os tipos de estruturas que podem ser criopreservadas e é notável o avanço das análises em estudos de criopreservação ao longo dos anos. Em orquídeas, o uso de sementes tem sido a forma mais utilizada nos últimos tempos em estudos de criopreservação, uma vez que grande parte da composição genética de uma planta será conservada (Das et al., 2021). Para a criopreservação de orquídeas, é necessário conhecer as alterações microestruturais e fisiológicas que podem ocorrer quando as sementes são submetidas a redução de umidade e armazenadas em temperaturas ultrabaixas (Ferrari et al., 2020).

Em sua maioria, as sementes de orquídeas são classificadas como ortodoxas, uma vez que sua longevidade é aumentada pela redução do teor de

água e da temperatura de armazenamento (Pritchard et al., 1999). Na literatura, a *Cattleya aurantiaca*, espécie epífita, tem suas sementes classificadas como ortodoxas (Seaton e Hailes, 1989), enquanto sementes de *Phaius tankervilleae*, espécie terrícola, são classificadas como recalcitrantes, por não tolerar a desidratação e exposição das sementes a baixas temperaturas (Hirano et al., 2009). Muitas vezes, mesmo sendo classificadas como ortodoxas, sementes de muitas orquídeas podem apresentar perda rápida da viabilidade quando armazenadas em comparação com outras espécies vegetais (Seaton e Pritchard, 2003).

Um dos grandes entraves nos estudos sobre a criopreservação de germoplasma de orquídeas, é o fato da família ser muito numerosa, limitando a obtenção de metodologias universais que abranjam todas as espécies existentes. Esse problema, que é devido a grande diversidade de orquídeas, envolve não apenas a criopreservação de sementes, mas todos os tipos de explantes possíveis, como protocormos, PLBs (Protocorm-like bodies), ápices caulinares e pólen. A criopreservação de sementes foi feita para 68 espécies de orquídeas, o que representa apenas 0,34% de toda a diversidade existente (Das et al., 2021). Dessa forma, o desenvolvimento de métodos de criopreservação, são imprescindíveis para manutenção da biodiversidade dessa grande família de plantas.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

- Estudar a eficiência da desidratação em sílica-gel na criopreservação de sementes de *C. guttata* e *E. denticulatum* com alta umidade.

2.2. Específicos

- Avaliar a eficiência da criopreservação pela técnica de desidratação em sílica-gel como forma de conservação a longo prazo de sementes maduras, com alta umidade, de *C. guttata* e *E. denticulatum*;
- Verificar a viabilidade das sementes de *C. guttata* e *E. denticulatum*, provenientes da criopreservação;
- Verificar o desenvolvimento das plantas obtidas *in vitro*, provenientes das sementes criopreservadas;
- Verificar a anatomia das plantas desenvolvidas *in vitro*, provenientes das sementes criopreservadas, por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- Verificar a viabilidade das mudas de orquídeas aclimatizadas provenientes das sementes criopreservadas;
- Verificar a estabilidade genética das plantas obtidas *in vitro*, provenientes das sementes criopreservadas, por meio de marcadores moleculares.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Família Orchidaceae: origem e aspectos botânicos

As orquídeas pertencem a família Orchidaceae, sendo considerada como uma das mais diversificadas e taxonomicamente complexas dentre as angiospermas (Phillips et al., 2012; Chase et al., 2015; Christenhusz e Byng, 2016).

A primeira evidência de orquídeas data de 15 a 20 milhões de anos a partir de políneas de *Meliorchis caribea* fossilizadas em âmbar do Mioceno presa a uma abelha já extinta, encontrada na República Dominicana (Ramírez et al., 2007). Após esse achado, *Succinantha baltica* fossilizada em âmbar do Eoceno do Báltico foi encontrada e datada com cerca de 40 a 45 milhões de anos atrás (Poinar e Rasmussen, 2017). No entanto, técnicas de biologia molecular indicam que, até o momento, as orquídeas possam ter origem há muito mais tempo, cerca de 76 a 84 milhões de anos durante o Cretáceo Superior (Ramírez et al., 2007).

Cinco subfamílias são reconhecidas dentre as orquídeas existentes, incluindo Apostasioideae (2 gêneros e 16 espécies), Vanilloideae (15 gêneros e 180 espécies), Cyripedioideae (5 gêneros e 130 espécies), Epidendroideae (mais de 500 gêneros e 20.000 espécies) e Orchidoideae (208 gêneros e 3.630 espécies) (Cameron et al., 1999; Lu et al., 2019, Şenel et al., 2019).

As orquídeas são classificadas como plantas herbáceas e perenes, suas flores possuem simetria zigomorfa, os estames são adnatos basalmente ao estilete, formando uma estrutura denominada de ginostêmio (Dressler, 1981). A

diversificação floral em Orchidaceae é bastante ampla, podendo ocorrer diferentes mecanismos evolutivos dentro de um mesmo gênero (Melo e Borba, 2011). De maneira geral, as flores das orquídeas são constituídas por três sépalas e três pétalas, uma dessas é modificada e recebe o nome de labelo (Givnish et al., 2015). O labelo, quase sempre maior, e mais vistoso, auxilia na reprodução dessas plantas como atrativo aos agentes polinizadores (Suttleworth et al., 1982).

A maioria das espécies de Orchidaceae possui grãos de pólen agrupados em estruturas denominadas de políneas, em conjunto com um viscidio, uma estrutura adesiva que se fixa aos polinizadores, os quais podem ser os mais diversos. As orquídeas são preferencialmente alógamas e suas estruturas florais são adaptadas para impedir a autopolinização (Johnson e Edwards, 2000). Dessa forma, a grande diversidade de orquídeas é assegurada pela polinização cruzada realizada por insetos. Quanto a forma de crescimento dessas plantas, as orquídeas podem ser do tipo prostrado (simpodial), ereto (monopodial) ou misto (Givnish et al., 2015).

Devido a ausência de endosperma, as minúsculas sementes necessitam de associação simbiótica com fungos micorrízicos espécie específicos, os quais, irão fornecer todos os nutrientes necessários a germinação em condições naturais. O tamanho das sementes varia entre 0,05 a 6 mm e sua massa de 0,24 a 0,31 μg (Arditti e Ghani, 2000). A ausência de endosperma nas sementes de orquídeas, conhecidas como “sementes de poeira”, é uma sinapomorfia que une quase todas as espécies dessa família (Lu et al., 2019). A produção de grande quantidade de sementes por fruto, é considerada uma estratégia evolutiva, por meio da qual as espécies aumentam as chances de estabelecimento das plantas em função da especificidade de seus habitats, permitindo a fixação de poucos indivíduos em locais distantes de sua origem, de maneira dispersa, gerando populações disjuntas (Pinheiro e Barros, 2005).

Relata-se que apesar da grande quantidade de sementes por cápsula (fruto), a porcentagem de germinação em condições naturais, não ultrapassa os 5%. Essas características fazem com que as orquídeas sejam sensíveis e vulneráveis a fatores bióticos e abióticos (Arditti e Ernst, 1984, Vinogradova e Andronova, 2002).

Com isso, técnicas de cultivo *in vitro* para germinação assimiótica, propagação e multiplicação em larga escala de orquídeas têm sido amplamente

utilizadas tanto para fins de conservação como também para o comércio (Dolce et al., 2020; Bhowmik e Rahman, 2020; Setiaji et al., 2021; Fatahi et al., 2022).

3.2. Importância econômica da família Orchidaceae

A família Orchidaceae representa atualmente uma das mais importantes na floricultura mundial. Dentre as técnicas de cultivo *in vitro* utilizadas para a produção, estão as técnicas de germinação assimbiótica de sementes e a micropropagação por meio da produção de PLBs *in vitro*, visando a produção em larga escala de mudas clonais (Cardoso et al., 2020).

As orquídeas são amplamente cultivadas para fins ornamentais, devido as suas belas flores coloridas e perfumadas (Kim et al., 2020). Dentre os principais gêneros de importância econômica para a floricultura, estão *Phalaenopsis*, *Cattleya*, *Dendrobium*, *Oncidium* e seus híbridos (Cardoso, 2012; Cardoso et al., 2016; Cardoso, 2017). Dentre os gêneros que são mais explorados como flores de vaso e corte estão *Cymbidium*, *Vanda* e *Phalaenopsis* (Cardoso et al., 2020).

No Brasil, a demanda por novas variedades de orquídeas é muito grande e, em 2020, o país importou mais de US\$ 20 milhões em mudas, sendo parte dessas originárias da Holanda e países da Ásia. Segundo dados do Market Report (2021), o mercado global de orquídeas, no ano de 2020, foi avaliado em mais de US\$ 5 bilhões e deve atingir mais de US\$ 7 bilhões até 2027, uma crescente, durante o período de previsão entre 2021 e 2027, de 4,6%.

A maior parte da produção comercial de orquídeas ocorre por meio da produção de híbridos a partir de cruzamentos interespecíficos, que incluem o uso de cruzamentos entre espécies do mesmo gênero, mas também espécies de diferentes gêneros conhecidos como híbridos intergenéricos (Cardoso, 2017).

Além do uso ornamental, as orquídeas são amplamente utilizadas nas indústrias de produtos alimentícios e de bebidas. Na medicina popular, utiliza-se folhas, raízes, flores, pseudobulbos, tubérculos, rizomas ou toda a planta (Singh e Duggal, 2009; Gutiérrez, 2010; Jalal et al., 2010; Pant, 2013). Na medicina chinesa, orquídeas do gênero *Dendrobium* e *Cymbidium* se destinam a produtos terapêuticos para o tratamento de várias doenças, como diabetes, câncer de pulmão, doenças do estômago, alergias e fadiga (Paek e Murthy, 2002; Ng et al., 2012; Liu et al., 2014). Quanto ao uso alimentício, na Tanzânia, Zâmbia e Malawi,

tubérculos de orquídeas terrestres pertencentes principalmente aos gêneros *Disa*, *Habenaria* e *Satyrium*, são utilizados na preparação de um alimento popular conhecido como *Chikanda* (Davenport e Ndangalasi, 2003; Veldman et al., 2014). No Leste do Mediterrâneo, os tubérculos secos de orquídeas terrestres dos gêneros *Orchis*, *Ophrys*, *Serapias*, *Platanthera*, e *Dactylorhiza* são conhecidos como *Salep*, e se refere ao pó de tubérculos moídos e à bebida feita a partir desse pó. O *Salep* é usado para produção de sorvetes, bebidas e na confeitaria (Tamer et al., 2006). Além desses, o produto mais conhecido a partir de orquídeas é a baunilha, um óleo aromático e condimentar extraído dos frutos de espécies do gênero *Vanilla*, notadamente *Vanilla planifolia* (Bulpitt, 2005).

Em termos de conservação de espécies que possuem interesse agrônômico, a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, no Brasil, inaugurou no ano de 2023, o primeiro banco de germoplasma de espécies que produzem baunilha, são mais de 70 acessos de orquídeas do gênero baunilha. Esse banco é considerado o único do mundo a possuir um volume significativo de espécies da América do Sul, podendo contribuir com programas de melhoramento para o desenvolvimento de cultivares adaptadas às condições do nosso país, auxiliando na conservação desses recursos genéticos vegetais tão importantes (Heberlê, 2023).

3.3. Desafios e estratégias para a conservação de espécies da família Orchidaceae

Assim como muitos outros grupos de plantas, as orquídeas enfrentam níveis de ameaça sem precedentes devido a destruição e fragmentação do habitat, coleta excessiva, mudanças climáticas e uma série de outros problemas induzidos por atividades antrópicas (Diamond, 1989; Swarts e Dixon, 2009; Reiter et al., 2016; Hinsley et al., 2018). Dentre as atividades antrópicas que comprometem a biodiversidade de orquídeas e de seus polinizadores de maneira muito agressiva, estão as hidrelétricas, uma vez que para a construção dessas estruturas, grandes áreas precisam ser alagadas, causando impactos irreversíveis e, atualmente, o Brasil possui 8.934 hidrelétricas ativas (Alho, 2020).

Apesar das orquídeas estarem sofrendo com os mais diversos tipos de impactos causados pelas ações antrópicas, elas são valorizadas como plantas comestíveis, medicinais, utilizadas em rituais e como espécies ornamentais há

milênios. As orquídeas são vendidas em mercados locais e regionais em todo o mundo (Hinsley et al., 2018).

Mesmo a família Orchidaceae estando protegida pela Convenção sobre Comércio Internacional nas Espécies Ameaçadas de Fauna e Flora Silvestres (CITES), o comércio ilegal não regulamentado e não documentado de orquídeas silvestres ainda é muito forte (Phelps e Webb, 2015). Além disso, as orquídeas representam aproximadamente 70% das espécies listadas na CITES (Hinsley et al., 2018). Com isso, o desenvolvimento de métodos para conservação é imprescindível para a manutenção da biodiversidade dessa família de plantas, evitando a perda de parte de sua diversidade genética.

Como forma de conservação, exemplares de plantas podem ser mantidos *in situ* (em seu habitat), requerendo mão de obra especializada, 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 têm desempenhado um papel significativo na conservação de orquídeas, por meio do desenvolvimento e manutenção cuidadosa de coleções vivas (por exemplo, o Royal Botanic Gardens, Kew, no Reino Unido, possui cerca de 2.700 espécies), armazenamento de sementes, estabelecimento e aprimoramento de técnicas de propagação *in vitro*, além da criação de criobancos e bancos de DNA para pesquisas filogenéticas (Kolomeitseva et al., 2011; Swarts e Dixon, 2009).

Como método de conservação *ex situ* (fora do seu habitat), podem ser conservadas em orquidários particulares ou em instituições públicas, como, por exemplo, o Orquidário Gustavo Denarde Nogueira/GDN, localizado no Brasil, no município de Campos dos Goytacazes – RJ, na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), o qual, foi inaugurado no ano de 2023. Possui aproximadamente 400 exemplares, entre espécies nativas e ameaçadas de extinção, além de híbridos inter e intraespecíficos cultivados em casa de vegetação. O orquidário conta com o apoio do Laboratório de Fitotecnia (LFIT), no Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA), onde as orquídeas são propagadas *in vitro* por meio de sementes.

A conservação *ex situ* de orquídeas, bem-sucedida, pode ser realizada por meio de bancos de sementes, cultivo *in vitro* e por meio da criopreservação.

Cada técnica de conservação, seja *in situ* ou *ex situ*, possui vantagens e desvantagens. Na conservação *ex situ*, a grande vantagem é que podemos proteger a variabilidade dos materiais vegetais, minimizando a erosão genética. Dentre as técnicas de conservação *ex situ*, a criopreservação é umas das mais confiáveis, que garante a conservação segura e econômica a longo prazo de várias espécies, incluindo aquelas com problemas de armazenamento de suas sementes (Engelmann, 2011).

3.4. Criopreservação de sementes de orquídeas

A criopreservação é uma técnica que permite a preservação de material biológico (células, tecidos e órgãos viáveis) em que o metabolismo celular é quase nulo. Este estado é obtido por meio da exposição do material a temperaturas ultrabaixas, tão baixas quanto -196°C em nitrogênio líquido (NL) ou na fase de vapor de nitrogênio a -150°C (Kantha, 1985).

Em orquídeas, a criopreservação traz benefícios duplos, dependendo do explante utilizado. Em primeiro lugar, tem-se a criopreservação de sementes, que pode ser utilizada para conservar a composição genética total das populações das espécies de orquídeas, uma vez que as sementes representam a máxima diversidade devido a alogamia. E, em segundo lugar, estão os explantes de tecidos somáticos; esses podem ser utilizados na conservação de genótipos específicos, preservando assim, estoques comerciais valiosos (Das et al., 2021). Dentre os explantes somáticos relatados na literatura em que a criopreservação foi bem-sucedida, cita-se as suspensões celulares (Tsukazaki et al., 2000; Yong et al., 2001), protocormos (Soonthornkalump et al., 2019; Chaipanich et al., 2019; Thammasiri, 2021) e PLBs (Imsomboon et al., 2020; Thammasiri, 2021). Além das sementes e tecidos somáticos, as políneas podem ser criopreservadas (Vendrame et al., 2008; Thammasiri, 2021). No caso das políneas, apenas metade do material genético de um dos parentais é conservado, sendo necessária a polinização de outra planta para a geração de novos descendentes.

O primeiro relato na literatura sobre exposição de sementes de orquídeas em NL a -196°C de maneira bem-sucedida foi feita por Pritchard (1984), e envolveu sementes maduras de oito espécies terrícolas e duas epífitas dos gêneros *Disa*, *Eulophia*, *Gymnadenia*, *Orchis*, *Satirium*, *Phalaenopsis* e *Vanda*.

Alguns estudos demonstram que o uso de sementes maduras com baixo conteúdo de água não necessita de crioprotetores antes da criopreservação. Esse comportamento foi observado em estudos com *Dendrobium candidum* (Wang et al., 1998), *Phaius tankervilleae* (Hirano et al., 2009), *Oncidium flexuosum* (Galdiano et al., 2013), *Epidendrum quitensium*, *Sobralia rosea* e *Epidendrum anderssonii* (Cerna et al., 2018) e também em *C. guttata* (Vettorazzi et al., 2020). No entanto, sementes maduras de algumas espécies de orquídeas com elevado conteúdo de água podem tolerar a exposição direta ao NL. Por exemplo, sementes de *Encyclia cochleata* com 24% de umidade, mesmo após a exposição em NL, não houve perda de viabilidade das sementes (Nikishina et al., 2001). Isso também foi observado em sementes maduras de *Bletilla formosana* com 24% de umidade, resultando em 68% de germinação, considerada alta (Wu et al., 2013).

Quanto ao uso de sementes imaturas, o primeiro relato envolvendo a criopreservação desse tipo de material foi realizado por Hirano et al. (2005), com sementes de *Bletilla striata*, por meio do método de vitrificação com o uso de PVS2. Desde então, com o surgimento de novas técnicas de criopreservação e a grande quantidade de recursos genéticos pertencentes a família Orchidaceae, novos estudos de conservação por meio da criopreservação passaram a ser feitos, porém, sementes imaturas apresentam um elevado conteúdo de água nos tecidos, pois as células em desenvolvimento são bastante vacuoladas. Sendo assim, a exposição direta de sementes imaturas ao NL pode ser letal (Hirano et al., 2005). A letalidade durante a criopreservação pode ocorrer devido a formação de gelo intracelular, fazendo com que haja o rompimento das membranas das células, causando a morte do tecido (Mazur, 1984). A criopreservação de materiais com elevado conteúdo de água só é possível por meio de desidratação controlada e mediante a aplicação de substâncias crioprotetoras, ou mesmo pela combinação de ambos (Engelmann, 2004). Em estudo realizado por Vettorazzi et al. (2020), o uso de substâncias crioprotetoras foi fundamental para a criopreservação de sementes do híbrido de *Cattleya harrisoniana* x *Cattleya walkeriana* e das espécies de *Cattleya tigrina*, *Cattleya amethystoglossa* e *Cattleya loddigesii*, com elevado teor de água.

Diante desse contexto, a criopreservação de orquídeas por meio de sementes tem se apresentado como uma das formas mais eficientes de conservação devido ao grande número de sementes por fruto. Além disso, essa é considerada a forma de criopreservação mais adotada em estudos de conservação.

No entanto, poucas espécies tiveram suas sementes estudadas, apenas 0,34% (Das, et al., 2021).

Dessa forma, novos estudos acerca da conservação de orquídeas por meio do uso de sementes precisam ser realizados, tendo em vista que a grande quantidade de sementes possibilita ter grande diversidade genética, devido a polinização cruzada, em um espaço bem reduzido, graças ao tamanho diminuto das sementes, sendo esses fatores importantes, contribuindo, assim, para a construção de bancos de germoplasma bem representativos.

3.5. Criopreservação pelo método de desidratação em sílica-gel

O sucesso na criopreservação depende da prevenção de danos letais às membranas celulares e organelas. Normalmente, esses danos estão associados ao teor de água e às características de expansão durante o congelamento e formação de cristais de gelo no interior das células (Ren et al., 2022). Assim, o ajuste do teor de água no interior das células, desencadeado pela desidratação do explante antes do congelamento, é fundamental (Coelho et al., 2018; Paula et al., 2018).

A desidratação conferida pela exposição do material a sílica gel é vantajosa tanto por ser uma técnica fácil e de baixo custo quanto por permitir preservar o material seco diretamente no NL sem o uso de crioprotetores que possam prevenir a toxicidade às células (Prada et al., 2015; Stegani et al., 2017). A desidratação é o processo mais simples de criopreservação e 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, a técnica proporciona boa sobrevivência quando as amostras são criopreservadas com umidade entre 10% e 20% (Engelmann, 1997).

Como citado anteriormente, a desidratação por meio do uso de sílica-gel é uma metodologia simples, e em orquídeas, consiste em armazenar sementes em envelopes de papel dentro de frascos de vidro contendo 50 g de sílica-gel em temperatura de (4°C) por determinado tempo de acordo com a espécie em estudo e o teor de água inicial das sementes. Em seguida, as sementes são transferidas

para criotubos antes da imersão em NL por uma hora. Para o descongelamento, os criotubos contendo as sementes são colocados rapidamente em água morna em temperatura de 40°C por dois minutos (Engelmann, 1997).

O uso da sílica-gel para desidratação de tecidos na criopreservação de orquídeas, tem sido utilizado em trabalhos envolvendo a criopreservação de protocormos de *Arundina graminifolia* (Cordova e Thammasiri, 2016), sementes de *Bletilla formosana* (Wu, et al., 2013) e de *C. amethystoglossa*, *C. lueddemanniana* e *C. warneri* (Vettorazzi, 2020).

Em *Arundina graminifolia*, por meio da técnica de placas criogênicas, o uso da sílica-gel como agente secante, foi adequado no processo de desidratação seguido da criopreservação em NL, promovendo as maiores taxas de sobrevivência e crescimento (77%) (Cordova e Thammasiri, 2016). Em *B. formosana*, o uso da desidratação de sementes em sílica-gel por duas horas, mostrou-se adequado para a conservação a longo prazo. Para essa espécie, o teor de água de 1,9 e 24,8% obtido por meio da sílica-gel, foi adequado para a criopreservação das sementes (Wu, et al., 2013).

Para as espécies *C. amethystoglossa*, *C. lueddemanniana* e *C. warneri*, a criopreservação por desidratação de sementes se mostrou-se um método eficaz e necessário para a conservação de sementes imaturas, no entanto, o sucesso da técnica está ligado ao conteúdo inicial de água das sementes (Vettorazzi, 2020).

3.6. Estabilidade genética na criopreservação de orquídeas: Marcadores moleculares

O uso de marcadores moleculares, em orquídeas, vem sendo amplamente aplicados a estudos voltados para a diversidade e estabilidade genética de plantas micropropagadas e criopreservadas obtidas a partir do cultivo *in vitro* (Worrachottiyanon e Bunnag, 2018; Jariyajirawattana e Bunnag, 2020; Khor et al., 2020; Tikendra et al., 2021). Além disso, a caracterização de germoplasma vegetal por meio de marcadores moleculares vem sendo utilizado, pelo fato de não sofrerem influência ambiental (Elias et al., 2001).

A estabilidade genética de plantas, tanto de espécies micropropagadas como criopreservadas, pode ser avaliada por meio do estudo de números de cromossomos, perfil de isoenzimas e marcadores moleculares baseados em PCR,

como o DNA polimórfico amplificado aleatório (RAPD), repetições de sequência simples inter (ISSR) e códon de início direcionado (SCoT) (Khor et al., 2020).

O *Inter Simple Sequence Repeats* (ISSR) é um marcador dominante que tem sido frequentemente utilizado para a análise da fidelidade, diversidade e estrutura genética de plantas obtidas por meio do cultivo *in vitro*, em virtude de ser reproduzível, simples, rápido e por necessitar de uma pequena quantidade de DNA (Bhatia et al., 2011, Liu et al., 2011).

Em estudos realizados por diversos autores, o uso de marcadores ISSR confirmaram de maneira eficiente a estabilidade genética em diversas espécies de orquídeas cultivadas *in vitro*, como por exemplo, *Vanilla planifolia* Jacks (Solano et al., 2019), *Habenaria edgeworthii* Hook. f. ex. Collett (Giri et al., 2012), *Anoectochilus elatus* Lindley (Sherif et al., 2018). Em estudo realizado por Bhattacharyya et al. (2014), a confirmação de estabilidade genética a partir do uso de DNA polimórfico amplificado aleatório (RAPD) e códon de início direcionado (SCoT) em plantas micropropagadas *in vitro* de *Dendrobium nobile* Lindl também se apresentou como um método eficiente.

A instabilidade genética observada nos tecidos vegetais é caracterizada por uma variação fenotípica de origem genética. Uma variação cromossômica que pode se tornar herdável nas gerações seguintes, ou epigenética, que é uma variação transitória devido ao estresse fisiológico que o material vegetal sofre, quando este é submetido ao cultivo *in vitro* (Bairu et al., 2011).

Até então, a estabilidade genética de plantas obtidas após a criopreservação de sementes desidratadas em sílica-gel, das espécies *C. guttata* e *E. denticulatum*, por meio de marcadores molecular do tipo ISSR ainda não foi realizada.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Setor de Horticultura do Laboratório de Fitotecnia (LFIT) do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) em Campos dos Goytacazes, RJ. O município se situa na latitude 21° 45' S e na longitude 41° 20' W e possui altitude média de 11 metros.

4.1. Germoplasma

Foram utilizadas sementes maduras de *C. guttata* e *E. denticulatum*. Os frutos contendo as sementes foram obtidos a partir de cruzamentos realizados em matrizes da mesma espécie pertencentes ao LFIT. As cápsulas de *C. guttata* e *E. denticulatum* foram coletadas quatro e três meses após a polinização, respectivamente, após apresentarem os primeiros sinais de abertura.

4.1.1. Caracterização das cápsulas e sementes

A viabilidade das sementes foi avaliada pelo Método do Tetrazólio, que consiste em deixar uma amostra de sementes em solução de 1% de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (Vetec®) por 24 horas a temperatura de 27±2°C, no escuro (Singh, 1999). 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.

A viabilidade das sementes de *C. guttata* e *E. denticulatum*, foi determinada pelo teste de tetrazólio e apresentou taxas de 88,94% e 85,95%, respectivamente, e o teor de água inicial das sementes antes da criopreservação foi de 56,90% e 70,57%, respectivamente (Figura 1) (Tabela 1).

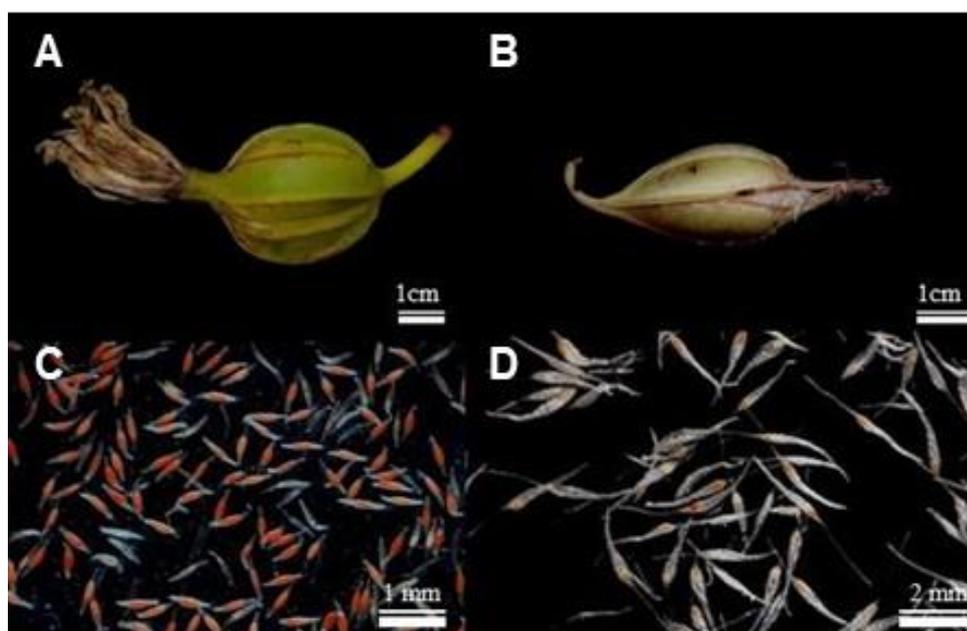


Figura 1. Aspecto morfológico das cápsulas (A e B) e das sementes coradas com tetrazólio (C e D) de *C. guttata* e *E. denticulatum*, respectivamente, utilizadas nos experimentos.

Tabela 1. Características biométricas e fisiológicas das cápsulas e das sementes de *C. guttata* e *E. denticulatum* utilizadas nos experimentos.

Características avaliadas	Dimensões / Valores	
	<i>C. guttata</i>	<i>E. denticulatum</i>
Comprimento da cápsula (cm)	5,80	6,33
Largura da cápsula (cm)	3,67	2,14
Massa da cápsula com sementes (g)	17,35	3,11
Massa das sementes (g)	1,33	0,73
Teor de água das sementes (%)	56,90	70,57
Viabilidade das sementes pelo método do tetrazólio (%)	88,94	85,95

4.1.2. Criopreservação das sementes de *C. guttata* e *E. denticulatum*

Para cada cápsula, o experimento de criopreservação foi conduzido em delineamento inteiramente ao acaso (DIC), com 12 tratamentos (Tabela 2) e cinco repetições. Cada repetição foi composta por um criotubo com 2 mL de volume total contendo 0,010 g (*C. guttata*) e 0,0010 g e (*E. denticulatum*) de sementes. Para *C. guttata* e *E. denticulatum* cada repetição correspondia a aproximadamente 6.000 e 400 sementes, respectivamente. Das cinco repetições de cada tratamento, uma foi utilizada para o teste de viabilidade e as outras quatro foram utilizadas para a germinação *in vitro*.

Tabela 2. Tratamentos utilizados no experimento de criopreservação de sementes de *C. guttata* e *E. denticulatum*.

Tratamentos
T1: 0h (Controle 1)
T2: 0h + NL (Controle 2)
T3: 24h na sílica-gel (Controle 3)
T4: 24h na sílica-gel + NL
T5: 48h na sílica-gel (Controle 4)
T6: 48h na sílica-gel + NL
T7: 72h na sílica-gel (Controle 5)
T8: 72h na sílica-gel + NL
T9: 96h na sílica-gel (Controle 6)
T10: 96h na sílica-gel + NL
T11: 30 dias na sílica-gel (Controle 7)
T12: 30 dias na sílica-gel + NL

Para a desidratação das sementes, foi adotada a metodologia proposta por Vettorazzi (2020), que consiste em armazenar as sementes em envelopes de papel dentro de frascos de vidro sobre 50 g de sílica-gel em temperatura de 4°C. Em seguida, as sementes foram transferidas para criotubos, antes da imersão em NL por uma hora. Após a imersão em NL, para o descongelamento, os criotubos

contendo as sementes foram colocados imediatamente em água morna em temperatura de 40°C, por dois minutos. Foram aplicados os testes de viabilidade em tetrazólio e germinação das sementes *in vitro* (Figura 2).

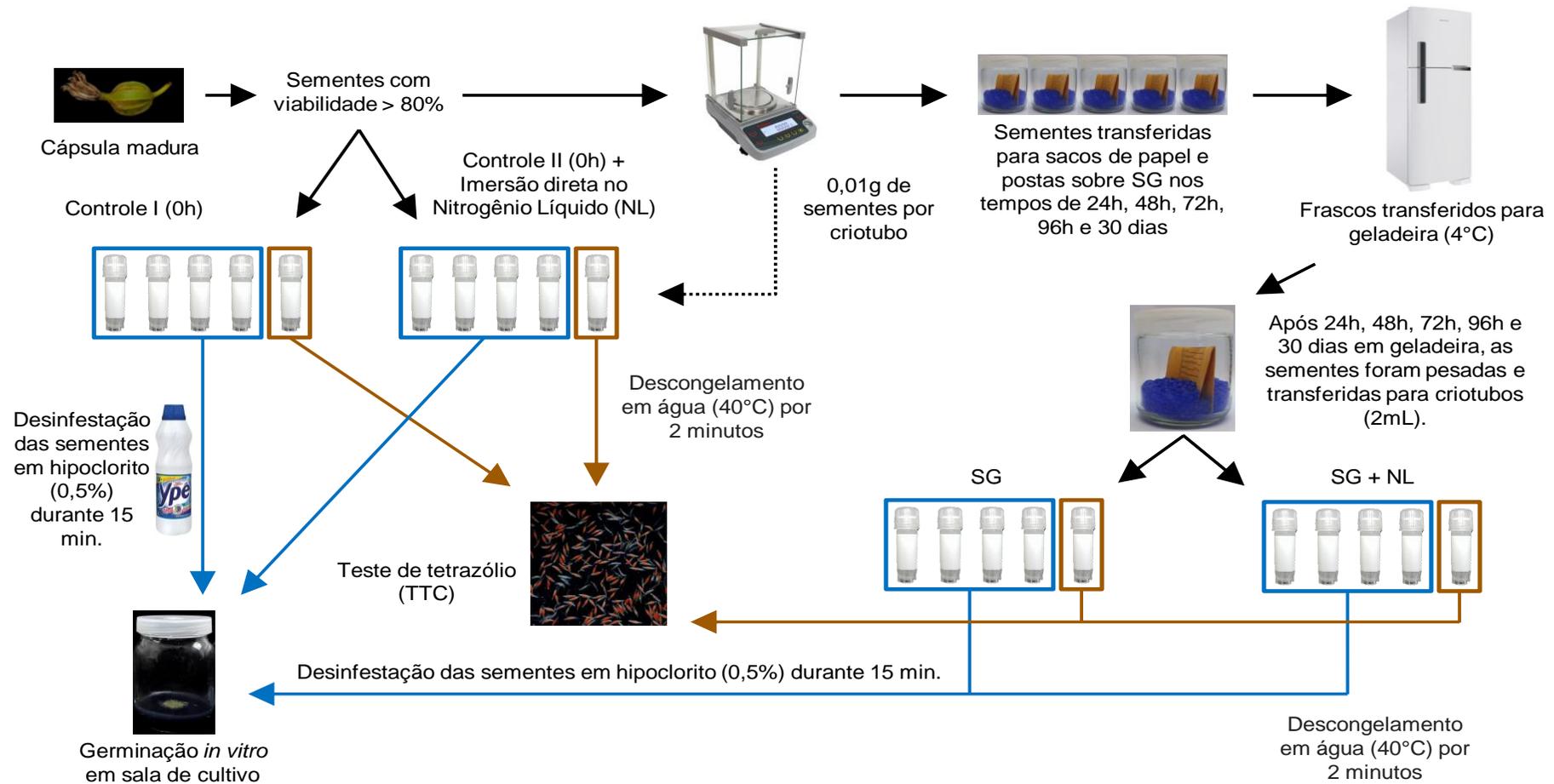


Figura 2. Fluxograma dos procedimentos de montagem dos experimentos de viabilidade pelo teste de tetrazólio e germinação *in vitro* após a aplicação do método de criopreservação de sementes de *C. guttata* e *E. denticulatum* por meio da desidratação em sílica-gel (SG).

4.1.3. Teste de viabilidade das sementes criopreservadas

O teste de viabilidade das sementes oriundas do experimento de criopreservação seguiu a mesma metodologia do 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 três placas de Petri. Cada placa de Petri consistiu em uma repetição, totalizando três repetições para cada tratamento.

4.1.4. Teste de germinação *in vitro* das sementes criopreservadas

Antes da semeadura, as sementes dos 12 tratamentos foram desinfestadas com hipoclorito de sódio (NaClO) (0,5%) durante 15 minutos. Em seguida, foram inoculadas em frascos (65 x 100 mm) contendo 40 mL de meio de cultura. Cada frasco correspondeu a um criotubo. O meio de cultura utilizado foi B&G Orquídeas[®], que contém macro e micronutrientes, sacarose e carvão ativado. O pH foi ajustado para $5,7 \pm 0,1$ e em seguida, solidificado com 10 g L^{-1} de ágar bacteriológico (Caisson[®]), antes da autoclavagem a 121°C e 1,1 atm de pressão por 20 minutos.

Os frascos foram acondicionados em sala de cultivo, com temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$ com fotoperíodo 16:8 horas (luz - escuro), fornecidas por lâmpadas LED brancas (Avant[®]) irradiância de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ por 90 dias até a avaliação da porcentagem de germinação. Para cada espécie, o experimento foi conduzido em DIC com 12 tratamentos e quatro repetições. Cada repetição consistiu de um frasco de cultivo contendo aproximadamente 6.000 e 400 sementes de *C. guttata* e *E. denticulatum*, respectivamente.

4.1.5. Crescimento *in vitro* das plântulas

Após a avaliação da germinação, uma porção de protocormos foi transferida para novos frascos contendo o mesmo meio de cultura e mantidas neste meio durante três meses antes de sua individualização para montagem do experimento. Em seguida, as plântulas foram individualizadas e inoculadas em frascos (65 x 125 mm) contendo 40 mL de meio de cultura. O meio de cultura utilizado para o crescimento *in vitro* das plântulas foi constituído pela metade da concentração dos sais minerais do meio MS (Murashige e Skoog, 1962) e das vitaminas de White

(White, 1943), 30 g L⁻¹ de sacarose e 2 g L⁻¹ de carvão ativado. O pH foi ajustado para 5,7±0,1 e em seguida, solidificado com 10 g L⁻¹ de ágar bacteriológico (Caisson®), antes da autoclavagem a 121°C e 1,1 atm de pressão.

Para cada espécie, o experimento foi conduzido em DIC com 12 tratamentos (*C. guttata*) e quatro tratamentos (*E. denticulatum*) com cinco repetições. Cada repetição constituiu de um frasco de cultivo contendo 10 plântulas. Após 10 meses de cultivo *in vitro*, as plântulas seguiram para as análises biométricas (número de folhas, área foliar (mm²), volume radicular (mL) e massa da matéria seca (mg) da parte aérea, raiz e total), fisiológicas (determinação da fluorescência da clorofila *a*, eficiência fotoquímica e índice fotossintético), microscópica (Microscopia Eletrônica de Varredura) e integridade genética das plantas por meio de marcadores moleculares ISSR. Das cinco repetições, três foram utilizadas para as análises biométricas e fisiológicas, uma repetição foi utilizada para a análise microscópica e uma repetição para a análise da integridade genética das plantas.

4.1.6. Aclimatização

Após o crescimento *in vitro*, as plantas foram transferidas para bandejas de polipropileno contendo 84 células (35 mL/célula). O substrato utilizado foi o musgo esfagno Big Moss®. A aclimatização foi feita em casa de vegetação, com cobertura de plástico (150 Micras) e tela de retenção de luminosidade (35%). As plantas foram irrigadas diariamente e adubadas semanalmente com uma solução de 5 mL L⁻¹ de adubo B&G Orquídeas® (3,5 mL da solução/célula).

Para o experimento de aclimatização, foram seguidos os mesmos tratamentos do cultivo *in vitro* e foi conduzido em um delineamento em blocos ao acaso (DBC) com 12 e quatro repetições para *C. guttata* e *E. denticulatum* respectivamente. Cada parcela foi constituída por cinco plantas.

Após sete meses de aclimatização, foram feitas análises biométricas (número de folhas, área foliar (mm²), volume radicular (mL) e massa da matéria seca (mg) da parte aérea, raiz e total), fisiológicas (determinação da fluorescência da clorofila *a*, eficiência fotoquímica e índice fotossintético).

4.1.6.1. ANÁLISES

4.1.6.2. Determinação da área foliar

A área foliar foi medida com o auxílio de um medidor de área foliar, modelo Licor 3100 (Li-Cor, 1996).

4.1.6.3. Determinação do volume radicular

O volume radicular foi determinado pelo deslocamento de água pela raiz em uma proveta de 10 mL, com auxílio de pinça e pipeta de Pasteur.

4.1.6.4. Análises fisiológicas

De cada uma das repetições, foram selecionadas três plantas aleatoriamente e foram submetidas às avaliações fisiológicas referentes ao índice de verde, a relação F_v/F_m e ao índice fotossintético (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).

4.1.6.5. Determinação da massa da matéria seca

Para determinar a massa da matéria seca, a parte aérea e as raízes das plantas foram acondicionadas separadamente em sacos de papel identificados e secados em estufa de circulação forçada de ar, a 70°C, até atingirem massa constante. Posteriormente, foram pesadas em balança analítica para determinação da massa da matéria seca da parte aérea, raiz e total.

4.1.6.6. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Foram utilizadas amostras de plantas dos tratamentos T1, T2 e T12 (*C. guttata*) e T1, T2 e T4 (*E. denticulatum*) obtidas após o cultivo *in vitro* (Tabela 1). Foram utilizadas folhas aleatórias completamente expandidas. Com o auxílio de uma lâmina de barbear, a região mediana das folhas foi cortada em fragmentos com cerca de 0,5 cm². Os fragmentos foram colocados em uma solução fixadora de formaldeído 4%, glutaraldeído 2,5% e tampão cacodilato de sódio 0,05 M. Posteriormente, foram feitas três lavagens em uma solução tampão de cacodilato de sódio 0,05% M, 45 minutos cada. Em seguida, as amostras foram colocadas em uma solução de tetróxido de ósmio 1%, tampão de cacodilato de sódio 0,05 M e ferricianeto de potássio 1% por 50 minutos. Após, foram feitas mais três lavagens em uma solução tampão de cacodilato de sódio 0,05 M, 45 minutos cada. Em seguida, foi feita desidratação em série com acetona: 50%, 70%, 90%, 100% (3x) sendo uma hora em cada série de desidratação. Posteriormente, os fragmentos foram dessecados no aparelho de ponto crítico de CO₂, modelo LEICA EM CPD300 por aproximadamente duas horas. Após isso, as amostras foram dispostas sob *stubs* de aço com superfície plana circular (7 x 6 mm) e fixadas com fita adesiva de carbono. As bordas dos *stubs* que não continham a fita adesiva de carbono foram pintadas com tinta de prata. Em seguida, as amostras foram cobertas com uma liga de ouro/paládio com auxílio de uma metalizadora, modelo BAL-TEC/SCD050 Sputter Coster. Posteriormente, as amostras foram observadas em um microscópio eletrônico de varredura, modelo EVO 40. As imagens foram processadas e capturadas com auxílio do software ZEISS.

4.1.6.7. Isolamento de DNA genômico e análise molecular via PCR

A extração de DNA genômico das amostras de *C. guttata* (T1, T2 e T12) e *E. denticulatum* (T1, T2 e T4), obtidas após o cultivo *in vitro*, seguiu o protocolo CTAB (Cetyltrimethylammonium bromide) descrito por Doyle & Doyle (1990). O DNA extraído foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1% sob voltagem constante de 100 V para averiguação da qualidade da extração por meio do perfil eletroforético das bandas obtidas (Figura 3) e quantificação das amostras de DNA

utilizando o software GelQuant. As amostras foram diluídas para a concentração 5 ng μL^{-1} .

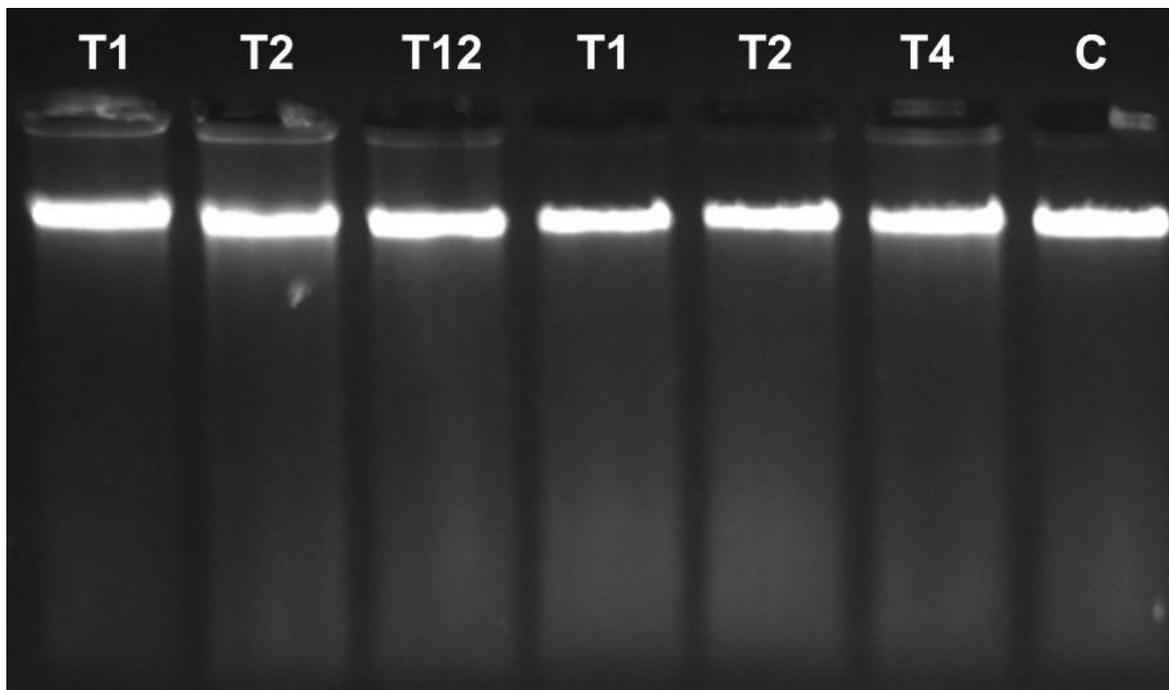


Figura 3. Qualidade do DNA extraído de *C. guttata* T1: 0h (Controle 1), T2: 0h + NL (Controle 2) e T12: 30 dias na sílica-gel + NL e *E. denticulatum* T1: 0h (Controle 1), T2: 0h + NL (Controle 2) e T4: 30 dias na sílica-gel + NL (G, H e I). DNA controle (C).

As reações de amplificação via PCR foram realizadas com um volume final de 13 μL contendo 10 ng de DNA, 1X de Tris-Base, 0,2 mM de dNTPs, 1,9 mM de MgCl_2 , 0,19 μM de cada primer (Tabela 3), 0,75 U de Taq DNA polimerase. As amplificações foram realizadas em termociclador Gradiente Eppendorf®, conforme o seguinte programa: desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C por 1 minuto para desnaturação, anelamento do primer por 1 minuto, 72°C por 3 minutos para extensão, seguidos de uma extensão final de 72°C por 7 minutos. Os produtos resultantes da amplificação foram corados com solução GelRed + Blue juice (1:1) e separados por eletroforese em gel de agarose 2% em tampão de corrida TAE 1X, sob voltagem (80 V) e amperagem (0,20 A) constantes. Posteriormente, os géis foram visualizados sob luz ultravioleta, e as imagens foram capturadas pelo sistema MiniBis Pro de fotodocumentação.

Tabela 3. Primers utilizados para a análise via PCR.

Nome	Sequência dos <i>primers</i>	Temperatura de Anelamento
9	TGTGTGTGTGTGTGTGGG	48°C
14	GAGAGAGAGAGAGAGAC	48°C
32	AGAGAGAGAGAGAGAGC	48°C
48	GAGAGAGAGAGAGAGAT	48°C
50	ACACACACACACACACC	48°C

4.1.6.8. Análise estatística

Para todos os experimentos da espécie *C. guttata*, e para os experimentos de germinação e viabilidade das sementes de *E. denticulatum*, os dados foram submetidos a pressuposição de normalidade utilizando o teste Shapiro-Wilk, posteriormente foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e o agrupamento das médias foi realizado pelo teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05$), utilizando o programa estatístico SISVAR (Statistical Analysis System), versão 5.6 (Ferreira, 2011).

Para *E. denticulatum*, os experimentos de crescimento *in vitro* e aclimatização das plantas, os dados foram submetidos a pressuposição de normalidade utilizando o teste Shapiro-Wilk, posteriormente foram submetidos a ANOVA e a comparação das médias foi realizada pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$), utilizando o programa estatístico SISVAR® (Statistical Analysis System), versão 5.6 (Ferreira, 2011).

Todas as variáveis dos experimentos *in vitro* e de aclimatização das plantas de *C. guttata* e *E. denticulatum* obtidas a partir das sementes criopreservadas, foram submetidas a matriz de correlação de Pearson a significância ($p < 0,05$). As análises de correlação dos dados foram realizadas com o auxílio do programa estatístico R Studio, versão 4.3.2 (R Core Team, 2023).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Cultivo *in vitro*

5.1.1. Viabilidade e germinação das sementes

Para as duas espécies, as sementes que apresentaram coloração vermelha foram consideradas viáveis e as demais, com coloração branca e variando do laranja ao creme foram consideradas inviáveis (Figura 4 e 6 M). 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.

Para *C. guttata* e *E. denticulatum*, foi observado efeito significativo dos tratamentos para as variáveis viabilidade (VI) e germinação (GER) das sementes.

As sementes de *C. guttata* com umidade inicial de 56,90% apresentaram maior viabilidade (95,72%) (Figura 4 A) e germinação (92,43%) (Figura 5 A) após a criopreservação, diferindo dos demais tratamentos (Tabela 4). Além disso, foi possível observar que as sementes que foram criopreservadas, que ficaram expostas a sílica-gel, nos tempos de 0h e 48h com umidade de 56,90% e 41,93%, respectivamente, apresentaram viabilidade e germinação igual ou superior aos controles que não foram imersos em NL (Tabela 4). Segundo Nikishina et al. (2001), aumentos na germinação após a criopreservação são relatados em algumas sementes de orquídeas tropicais, como, *Calanthe vestita*, *C. gorey*, *Angraecum*

magdalенаe, *Trichopilia tortilis*, *Encyclia cochleata*, *Eulophyella roempleriana* e *Epigenium* sp. O mesmo comportamento foi encontrado nas espécies *Ophrys sphegodes* ssp. *passionis* e *Orchis mascula* (Pirondini e Sgarbi, 2014). Em estudo realizado por Diantina et al. (2023), o uso de crioprotetores para a criopreservação de sementes de *Dendrobium strebloceras*, *D. lineale*, *D. cunninghamii*, *Banksii* e *Thelymitra nervosa* não é necessário, sendo assim, a imersão direta em NL é suficiente para a conservação dessas espécies. Neste estudo, além do aumento na germinação das sementes, a imersão direta em NL também proporcionou aumento na formação de brotos nas plantas obtidas.

Esse comportamento, de aumento na germinação, dá-se devido a ruptura do tegumento da semente durante o ciclo de congelamento-descongelamento, aumentando a permeabilidade do tegumento, resultando em germinação mais rápida. Essa ruptura tegumentar após a exposição ao NL, contribui também para maior embebição do tetrazólio. No entanto, essa permeabilidade pode diferir dependendo da estrutura e composição do tegumento das sementes (Pritchard, 1984). Isso explica o aumento na viabilidade observado nos resultados do teste de tetrazólio em sementes de *C. guttata*, expostas ao NL. Nos tempos de 96h e 30 dias em sílica-gel, foi observado decréscimo na viabilidade das sementes quando essas foram expostas ao NL, sendo inferior ou igual ao tratamento controle. O mesmo comportamento foi observado para germinação, porém, todos os tratamentos em que as sementes são expostas ao NL diferem do tratamento controle (Tabela 4; Figura 4 e 5). Após 30 dias, sementes com umidade de 2,11%, apresentaram viabilidade de 66,18% (T11 controle) e 50,13% (T12), com germinação de 32,43% e 24,07%, respectivamente.

Tabela 4. Viabilidade (%) de sementes de *C. guttata* coradas com 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio (TTC), umidade das sementes (%) e germinação (%) das sementes criopreservadas em NL ao longo de 30 dias em diferentes tempos.

Tratamentos	<i>C. guttata</i>		
	Viabilidade (%)	Umidade das sementes (%)	Germinação (%)
T1: 0h (Controle 1)	88,94 b	56,90	91,22 b
T2: 0h + NL (Controle 2)	95,72 a		92,43 a
T3: 24h na sílica-gel (Controle 3)	87,44 b	51,27	85,47 d
T4: 24h na sílica-gel + NL	90,11 b		88,44 c
T5: 48h na sílica-gel (Controle 4)	84,94 c	41,93	81,40 f
T6: 48h na sílica-gel + NL	86,74 b		82,52 e
T7: 72h na sílica-gel (Controle 5)	82,36 c	32,83	75,16 g
T8: 72h na sílica-gel + NL	81,60 c		72,38 i
T9: 96h na sílica-gel (Controle 6)	78,12 d	25,71	74,16 h
T10: 96h na sílica-gel + NL	71,46 e		67,26 j
T11: 30 dias na sílica-gel (Controle 7)	66,18 f	2,11	32,43 k
T12: 30 dias na sílica-gel + NL	50,13 g		24,07 l
Média	80,31		72,24

Médias seguidas da mesma letra, na coluna, pertencem ao mesmo grupo pelo teste Scott-Knott ($P \leq 0,05$).

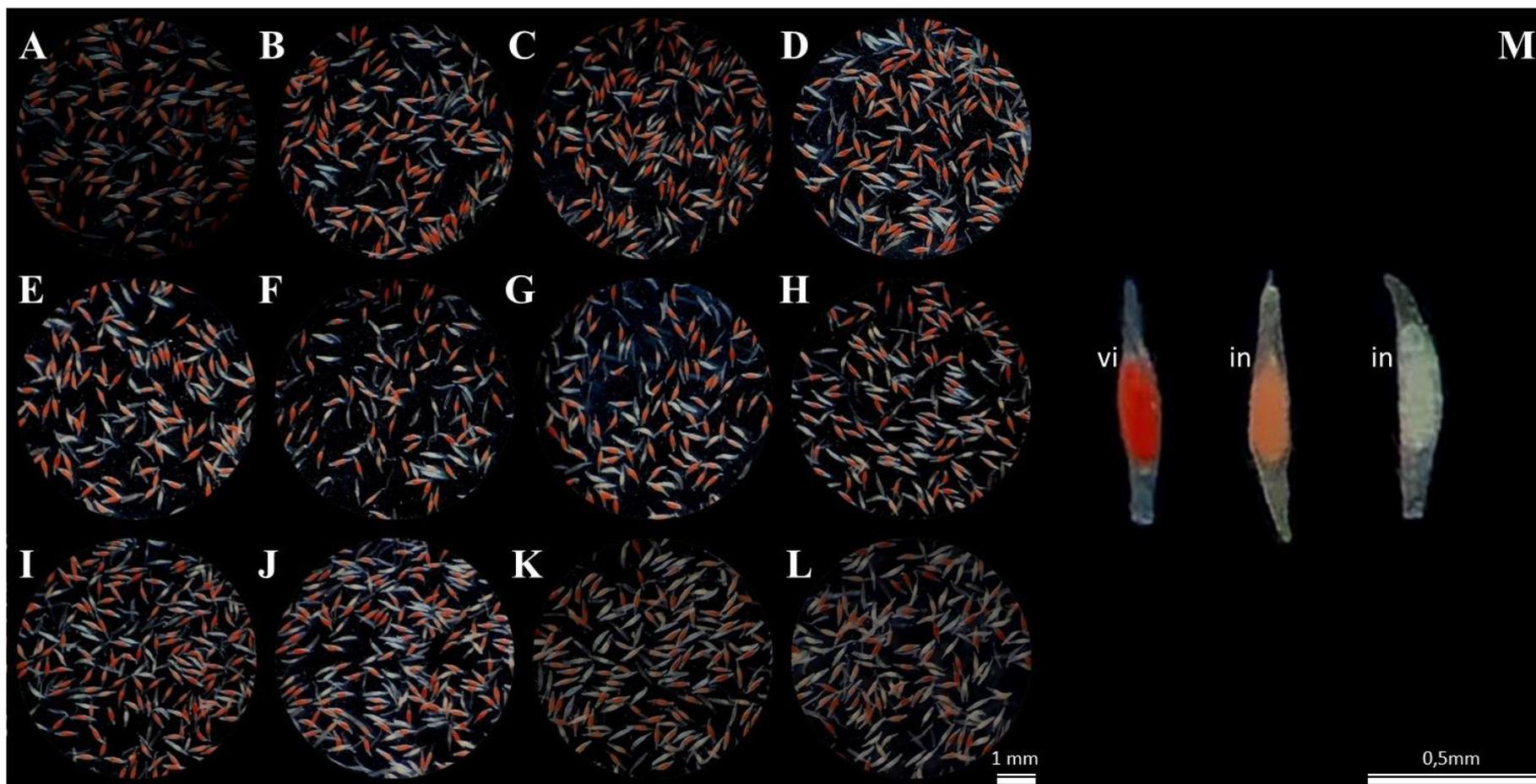


Figura 4. Viabilidade das sementes de *C. guttata* coradas com 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio (TTC). T1: 0h (Controle 1) (A), T2: 0h + NL (Controle 2) (B), T3: 24h na sílica-gel (Controle 3) (C), T4: 24h na sílica-gel + NL (D), T5: 48h na sílica-gel (Controle 4) (E), T6: 48h na sílica-gel + NL (F), T7: 72h na sílica-gel (Controle 5) (G), T8: 72h na sílica-gel + NL (H), T9: 96h na sílica-gel (Controle 6) (I), T10: 96h na sílica-gel + NL (J), T11: 30 dias na sílica-gel (Controle 7) (K) e T12: 30 dias na sílica-gel + NL (L). (M): Semente viável (vi) e sementes inviáveis (in).

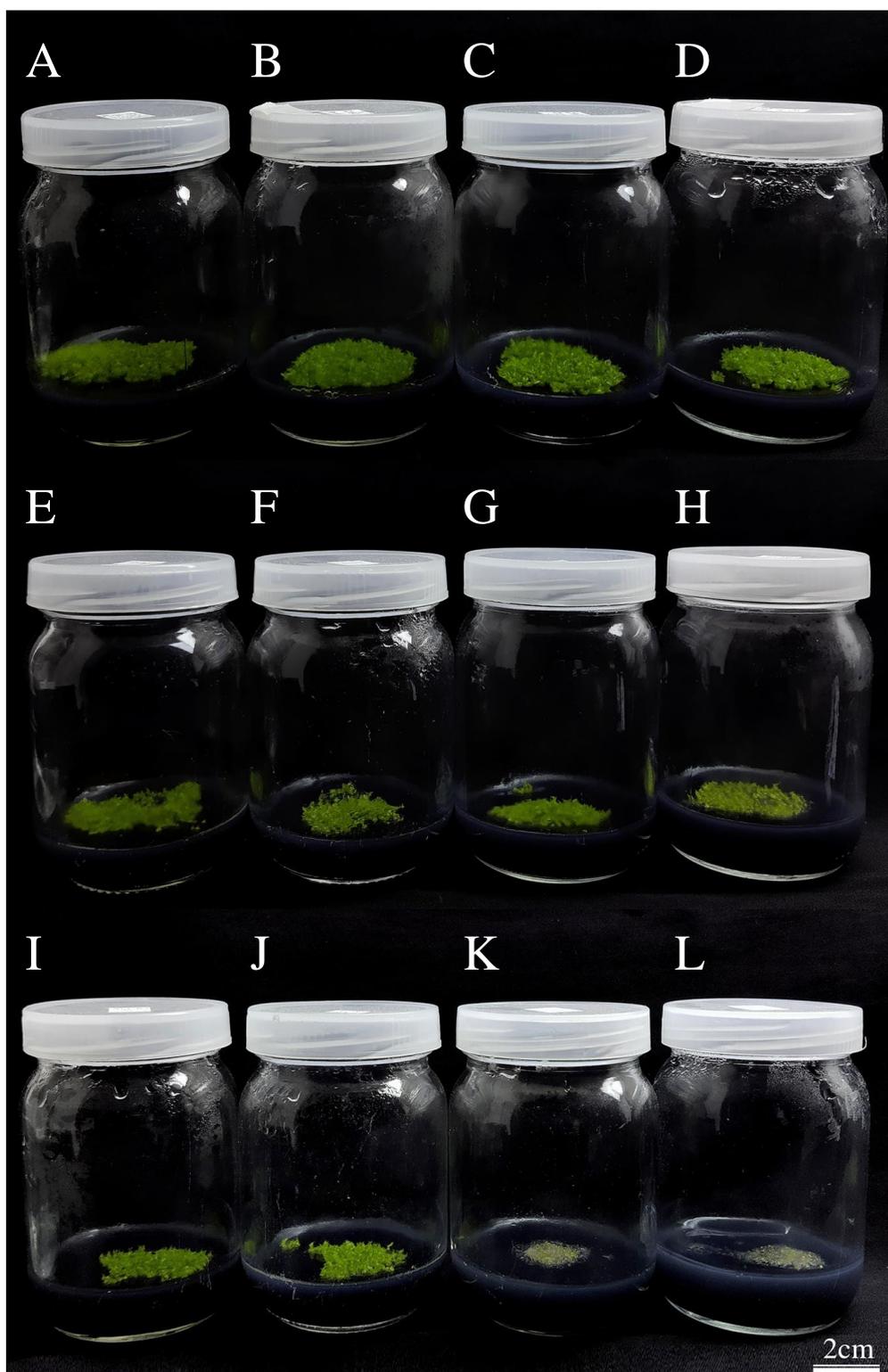


Figura 5. Germinação das sementes de *C. guttata* após 90 dias de semeio *in vitro*. T1: 0h (Controle 1) (A), T2: 0h + NL (Controle 2) (B), T3: 24h na sílica-gel (Controle 3) (C), T4: 24h na sílica-gel + NL (D), T5: 48h na sílica-gel (Controle 4) (E), T6: 48h na sílica-gel + NL (F), T7: 72h na sílica-gel (Controle 5) (G), T8: 72h na sílica-gel + NL (H), T9: 96h na sílica-gel (Controle 6) (I), T10: 96h na sílica-gel + NL (J), T11: 30 dias na sílica-gel (Controle 7) (K) e T12: 30 dias na sílica-gel + NL (L).

Para as sementes de *E. denticulatum* com umidade inicial de 70,57%, o tratamento controle (T1) apresentou maior viabilidade (85,94%) (Tabela 5; Figura 6 A) e germinação (49,36%) (Tabela 5; Figura 7 A), diferindo dos demais. A imersão direta das sementes em NL (T2) resultou em diminuição na viabilidade de 85,94% para 56,45% e na germinação de 49,36% para 26,25%. Para todos os tratamentos em que foram observadas sementes viáveis e germinação, o tratamento controle apresentou maior média, diferindo estatisticamente em relação as sementes que foram expostas ao NL. Não foram observadas sementes viáveis nos tratamentos de 96h na sílica + NL (T10), 30 dias (T11 controle) e 30 dias na sílica + NL (T12) (Tabela 5; Figura 6 J, K e L).

Tabela 5. Viabilidade (%) de sementes de *E. denticulatum* coradas com 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio (TTC), umidade das sementes (%) e germinação (%) das sementes criopreservadas em NL ao longo de 30 dias em diferentes tempos

Tratamentos	<i>E. denticulatum</i>		
	Viabilidade (%)	Umidade das sementes (%)	Germinação (%)
T1: 0h (Controle 1)	85,94 a	70,57	49,36 a
T2: 0h + NL (Controle 2)	56,45 b		26,25 b
T3: 24h na sílica-gel (Controle 3)	42,34 c	68,67	12,53 c
T4: 24h na sílica-gel + NL	13,10 e		7,92 d
T5: 48h na sílica-gel (Controle 4)	22,99 d	55,58	3,15 e
T6: 48h na sílica-gel + NL	8,04 f		0,76 f
T7: 72h na sílica-gel (Controle 5)	1,34 g	48,16	0,34 g
T8: 72h na sílica-gel + NL	0,85 h		0,00 h
T9: 96h na sílica-gel (Controle 6)	0,64 h	48,06	0,00 h
T10: 96h na sílica-gel + NL	0,00 i		0,00 h
T11: 30 dias na sílica-gel (Controle 7)	0,00 i	1,32	0,00 h
T12: 30 dias na sílica-gel + NL	0,00 i		0,00 h
Média	19,31		8,36

Médias seguidas da mesma letra, na coluna, pertencem ao mesmo grupo pelo teste Scott-Knott ($P \leq 0,05$).



Figura 6. Viabilidade das sementes de *E. denticulatum* coradas com 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio (TTC). T1: 0h (Controle 1) (A), T2: 0h + NL (Controle 2) (B), T3: 24h na sílica-gel (Controle 3) (C), T4: 24h na sílica-gel + NL (D), T5: 48h na sílica-gel (Controle 4) (E), T6: 48h na sílica-gel + NL (F), T7: 72h na sílica-gel (Controle 5) (G), T8: 72h na sílica-gel + NL (H), T9: 96h na sílica-gel (Controle 6) (I), T10: 96h na sílica-gel + NL (J), T11: 30 dias na sílica-gel (Controle 7) (K) e T12: 30 dias na sílica-gel + NL (L). (M): Sementes viáveis (vi) e sementes inviáveis (in).

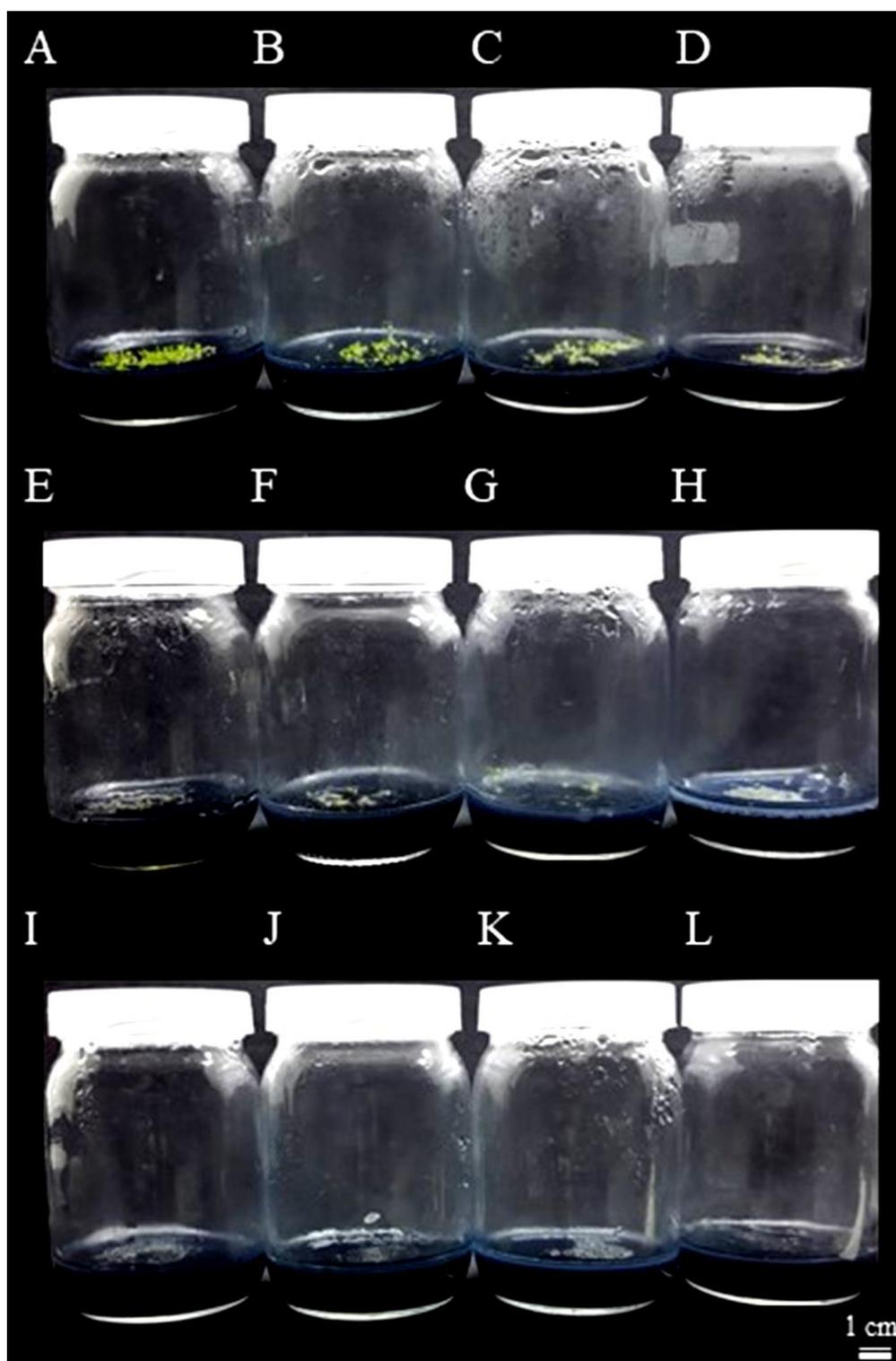


Figura 7. Germinação das sementes de *E. denticulatum* após 90 dias de sementeo *in vitro*. T1: 0h (Controle 1) (A), T2: 0h + NL (Controle 2) (B), T3: 24h na sílica-gel (Controle 3) (C), T4: 24h na sílica-gel + NL (D), T5: 48h na sílica-gel (Controle 4) (E), T6: 48h na sílica-gel + NL (F), T7: 72h na sílica-gel (Controle 5) (G), T8: 72h na sílica-gel + NL (H), T9: 96h na sílica-gel (Controle 6) (I), T10: 96h na sílica-gel + NL (J), T11: 30 dias na sílica-gel (Controle 7) (K) e T12: 30 dias na sílica-gel + NL (L).

Sementes de *C. guttata* e de *E. denticulatum* tiveram sua viabilidade e germinação comprometidas pela desidratação em sílica-gel e posterior armazenamento em baixas temperaturas, de geladeira (tratamento controle) e de NL. Sementes de *Cattleya aurantiaca* são classificadas como ortodoxas devido à sua tolerância a desidratação em sílica-gel, seguidas de armazenamento hermético a 5°C durante seis anos, com umidade de 3,7 e 10,4% com germinação de 36% e 70%, respectivamente (Seaton e Hailes, 1989). Dentro do gênero *Cattleya*, pode-se observar que diferentes espécies se comportam de maneira distinta, quando expostas a desidratação em sílica-gel e a baixas temperaturas de armazenamento.

A desidratação das sementes em sílica-gel, não foi adequada antes da criopreservação de sementes de *C. guttata*, as quais, foram coletadas logo após a coleta de seu fruto, ainda verde e com uma pequena abertura antes da dispersão de suas sementes. Sendo assim, o ideal para *C. guttata* nas condições desse estudo, foi a imersão direta das sementes sem passar pelo processo de desidratação. Em estudo realizado por Vettorazzi et al. (2019), com *C. guttata*, o uso de sementes secas com umidade de 6,15% e viabilidade inicial de 88,2%, teve apenas 9,4% de sua germinação comprometida após a exposição direta das sementes ao NL. Isso pode ser explicado pela utilização de sementes que passaram por um processo natural de desidratação e que completaram o seu ciclo de maturação na planta mãe. No presente estudo, as sementes não tiveram tempo para maturar e a desidratação em sílica-gel comprometeu a viabilidade e a germinação. Dessa forma, para *C. guttata*, o uso de sementes com baixa umidade na criopreservação só será adequada quando essa perda de umidade ocorrer naturalmente.

Com base nos dados de viabilidade e germinação para *E. denticulatum*, o ideal também é a imersão direta das sementes em NL quando essas ainda apresentam alta umidade. Sementes de *E. denticulatum* não toleram a desidratação em sílica-gel. No presente estudo, podemos observar que cápsulas abertas de *E. denticulatum*, já em processo de dispersão das sementes, apresentam maior umidade que cápsulas de *C. guttata* no início da abertura (Figura 1; Tabela 1). Diferente de *C. guttata*, sementes de *E. denticulatum*, naturalmente precisam ser dispersas com alta umidade antes que tenham a sua viabilidade e germinação comprometidas.

Assim como *C. guttata*, sementes de *E. denticulatum* não toleram a desidratação em sílica-gel e conservação em baixas temperaturas de geladeira (tratamento controle) e de NL, uma vez que essas sementes tiveram sua viabilidade e germinação comprometidas.

Para criopreservação de *E. denticulatum*, o ideal é que as sementes possuam alta umidade (70,57%) e cápsulas com sementes que apresentem alta viabilidade, uma vez que a imersão direta em NL reduziu a viabilidade e germinação das sementes em 30% e 24%, respectivamente.

Segundo Das et al. (2021), o método de imersão direta das sementes em NL deve funcionar muito bem para sementes da maioria das espécies de orquídeas tropicais, devido ao baixo teor de água das sementes e tolerância natural a desidratação.

5.1.2. Crescimento *in vitro*

5.1.2.1. Análises biométricas

Para *C. guttata*, foi observado efeito significativo para todas as variáveis biométricas avaliadas: número de folhas (NF), volume radicular (VR), área foliar (AF), massa da matéria seca da parte aérea (MMSPA), raiz (MMSR) e total (MMST). Para *E. denticulatum*, houve efeito significativo apenas para a variável número de folhas (NF).

Após um ano de cultivo *in vitro* (*C. guttata*) e 10 meses (*E. denticulatum*), as sementes germinadas de cada espécie, desenvolveram plantas normais, com raiz e parte aérea expandidas em todos os tratamentos em que houve germinação (Figuras 8 e 9).

Para *C. guttata*, o maior tempo de exposição das sementes a sílica-gel + NL (30 dias), favoreceu o desenvolvimento do maior número de folhas (5,13), diferindo de todos os demais tratamentos. De maneira contrastante com o maior tempo de exposição das sementes a sílica-gel, o tratamento controle de 0h apresentou a menor média (3,53), também diferindo de todos os demais tratamentos. A presença do NL favoreceu maior número de folhas em todos os tratamentos, apresentando média superior ou igual em relação ao controle. Esse comportamento não foi observado apenas para o tempo de 24h (T3 e T4) (Tabela 6; Figura 8).

Para volume radicular, as maiores médias 0,46 e 0,41, foram observadas nos tratamentos de 72h (T7 controle) e em 96h (T10) respectivamente, não diferindo entre si. Para essa variável, foi observada que existe uma tendência a maiores médias naqueles tratamentos em que as sementes foram expostas ao NL em relação ao controle, exceto para os tratamentos de 72h (T7 controle) e 30 dias (T11 controle) (Tabela 6; Figura 8).

Para variável área foliar, a maior média (1,74), foi observada no tratamento controle de 72h (T7), porém, não houve diferença entre o tratamento com NL para o mesmo tempo (T8). Também não foi observada diferença entre 48h (T5 controle) e 96h (T10). A exposição das sementes em sílica-gel e posterior imersão em NL, entre os tempos de 72 e 96h, favoreceu uma maior área foliar, sendo observada média superior ou igual em relação ao controle (Tabela 6; Figura 8).

Para massa da matéria seca da parte aérea, a maior média (0,028), foi observada no tratamento controle de 72h. Porém, para essa variável, todos os demais tratamentos apresentaram média superior ou igual ao tratamento controle, exceto T8 (72h) (Tabela 6; Figura 8).

A variável massa da matéria seca da raiz apresentou as maiores médias nos tratamentos de 96h (T10) e 72h (T7 controle), sendo 0,037 e 0,035 respectivamente, não apresentando diferença estatística. Todos os demais tratamentos não diferiram entre si, porém, os tratamentos em que as sementes foram imersas em NL, apresentaram maiores médias em relação ao tratamento controle, exceto os tratamentos de 72h (T7 controle) e 30 dias (T11 controle).

Para massa da matéria seca total, as maiores médias foram observadas em 72h (T7 controle) e 96h (T10), sendo 0,063 e 0,060, respectivamente, não diferindo entre si. Todos os demais tratamentos apresentaram média superior ou igual ao tratamento controle (Tabela 6).

Para a espécie *C. guttata*, podemos afirmar que houve maior velocidade na germinação das sementes para a maioria dos tratamentos em que houve exposição das sementes ao NL. Segundo Pritchard (1984), a exposição de sementes de orquídeas ao NL pode proporcionar uma maior velocidade na germinação, influenciando diretamente na velocidade de crescimento das plantas obtidas. Sendo assim, para *C. guttata*, todas as variáveis biométricas foram beneficiadas, promovendo maior crescimento das mudas por meio da exposição das sementes ao NL.

Tabela 6. Número de folhas (NF), volume radicular (VR), área foliar (AF), massa da matéria seca da parte aérea (MMSPA), massa da matéria seca da raiz (MMSR) e massa da matéria seca total (MMST) de plantas de *C. guttata* provenientes de sementes criopreservadas após um ano de cultivo *in vitro*

Tratamentos	<i>C. guttata</i>		
	NF	VR	AF
T1: 0h (Controle 1)	3,53 d	0,22 b	0,72 b
T2: 0h + NL (Controle 2)	4,00 c	0,31 b	0,93 b
T3: 24h na sílica-gel (Controle 3)	4,33 b	0,18 b	0,66 c
T4: 24h na sílica-gel + NL	3,93 c	0,33 b	1,04 b
T5: 48h na sílica-gel (Controle 4)	4,40 b	0,26 b	1,34 a
T6: 48h na sílica-gel + NL	4,33 b	0,28 b	1,02 b
T7: 72h na sílica-gel (Controle 5)	3,66 c	0,46 a	1,74 a
T8: 72h na sílica-gel + NL	4,53 b	0,30 b	1,53 a
T9: 96h na sílica-gel (Controle 6)	4,13 c	0,34 b	1,05 b
T10: 96h na sílica-gel + NL	4,46 b	0,41 a	1,56 a
T11: 30 dias na sílica-gel (Controle 7)	4,40 b	0,30 b	1,05 b
T12: 30 dias na sílica-gel + NL	5,13 a	0,24 b	1,13 b
Média	4,23	0,30	1,15
Tratamentos	MMSPA	MMSR	MMST
T1: 0h (Controle 1)	0,01 c	0,01 b	0,03 c
T2: 0h + NL (Controle 2)	0,02 b	0,02 b	0,04 b
T3: 24h na sílica-gel (Controle 3)	0,01 c	0,01 b	0,03 c
T4: 24h na sílica-gel + NL	0,01 c	0,02 b	0,04 b
T5: 48h na sílica-gel (Controle 4)	0,02 b	0,02 b	0,04 b
T6: 48h na sílica-gel + NL	0,02 b	0,02 b	0,04 b
T7: 72h na sílica-gel (Controle 5)	0,02 a	0,03 a	0,06 a
T8: 72h na sílica-gel + NL	0,02 b	0,02 b	0,05 b
T9: 96h na sílica-gel (Controle 6)	0,01 c	0,02 b	0,04 b
T10: 96h na sílica-gel + NL	0,02 b	0,03 a	0,06 a
T11: 30 dias na sílica-gel (Controle 7)	0,01 c	0,02 b	0,04 c
T12: 30 dias na sílica-gel + NL	0,01 c	0,02 b	0,04 c
Média	0,02	0,02	0,04

Médias seguidas da mesma letra, na coluna, pertencem ao mesmo grupo pelo teste Scott-Knott ($P \leq 0,05$).

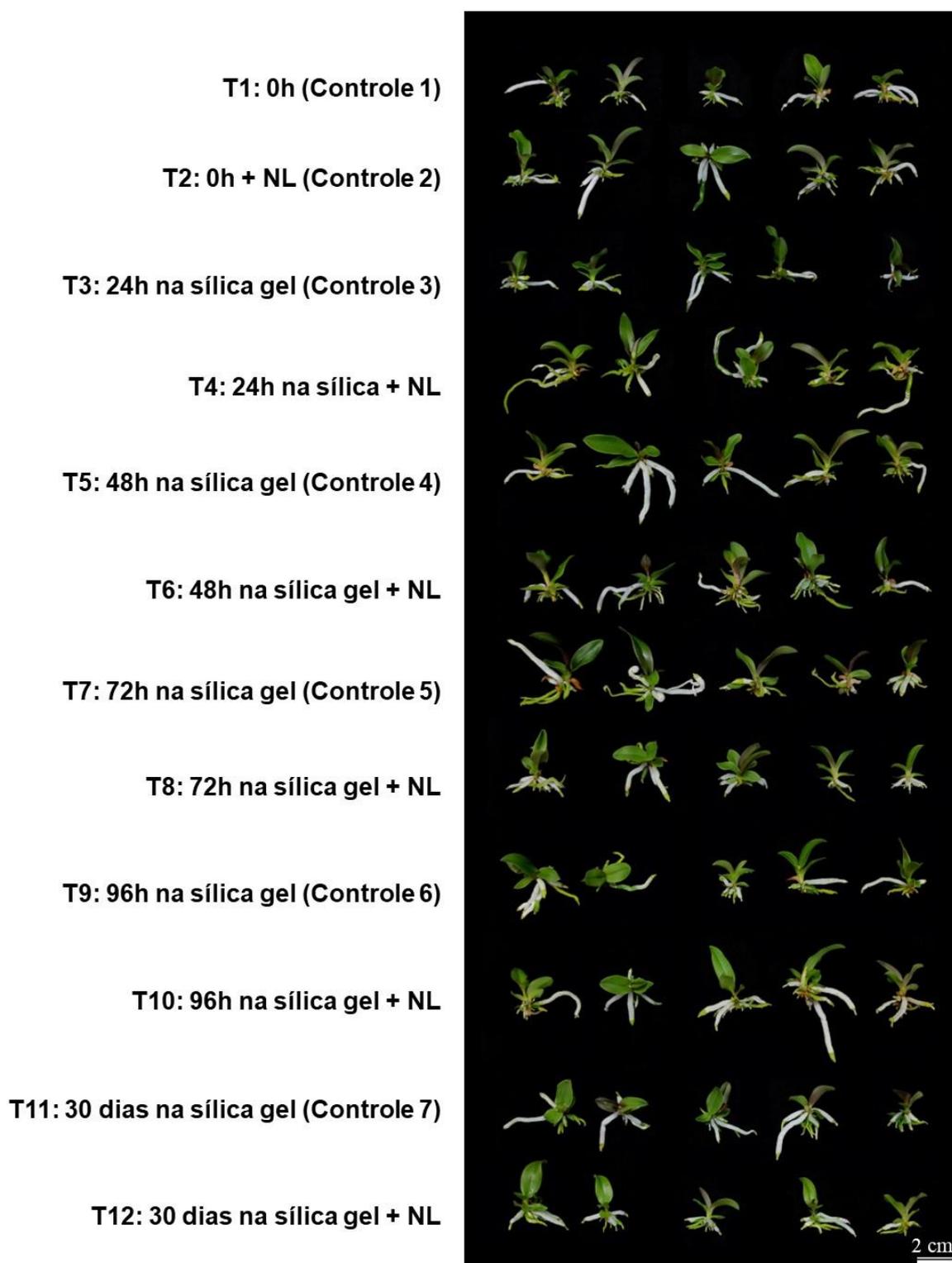


Figura 8. Plantas de *C. guttata* obtidas um ano após o semeio *in vitro*.

Em *E. denticulatum*, os tratamentos empregados no experimento de crescimento *in vitro* das mudas, não influenciaram a maioria das variáveis biométricas avaliadas, exceto para o número de folhas. Para essa variável, o tratamento controle de 0h (T1 Controle) apresentou a maior média (6,25), diferindo

apenas do tratamento de 24h (T4) (5,10) (Tabela 7). Observa-se menor número de folhas entre os tratamentos quando associado a presença da sílica-gel + NL. Entre os tratamentos, houve um efeito negativo quando as sementes foram expostas a desidratação em sílica-gel e ao NL.

Tabela 7. Número de folhas (NF) de plantas de *E. denticulatum* provenientes de sementes criopreservadas após 10 meses de cultivo *in vitro*.

Tratamentos	<i>E. denticulatum</i>
	NF
T1: 0h (Controle 1)	6,25 a
T2: 0h + NL (Controle 2)	6,05 ab
T3: 24h na sílica-gel (Controle 3)	5,85 ab
T4: 24h na sílica-gel + NL	5,10 b
Média	5,81

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

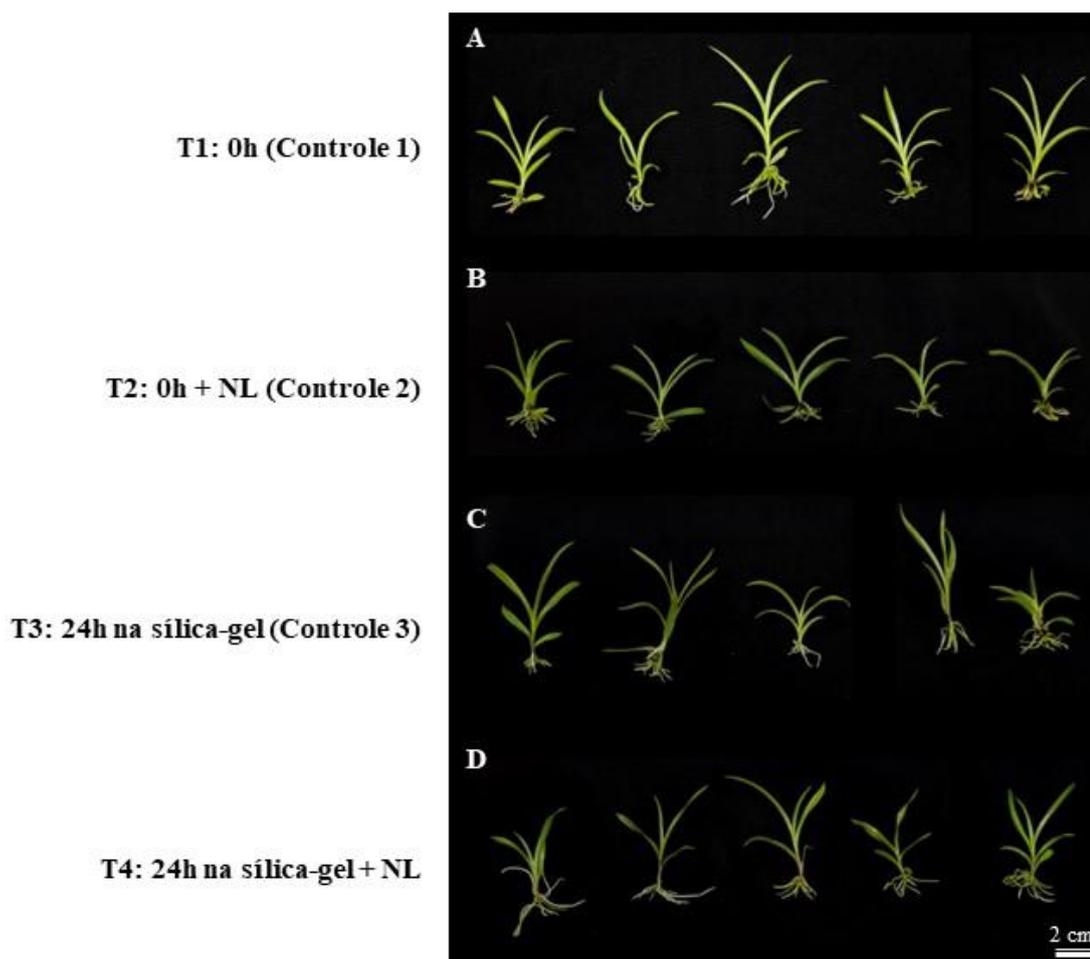


Figura 9. Plantas de *E. denticulatum* obtidas 10 meses após o semeio *in vitro*.

5.1.2.2. Análises fisiológicas

Para *C. guttata*, não foi observado efeito significativo para todas as variáveis fisiológicas: relação Fv/Fm, índice fotossintético (PI) e índice de verde (IV). Para *E. denticulatum*, houve efeito significativo para a relação Fv/Fm e índice fotossintético (PI). Não foi observado efeito significativo entre os tratamentos para o índice de verde (IV) em *E. denticulatum*.

Para *C. guttata*, os valores observados para a relação Fv/Fm apresentaram resultados entre 0,75 e 0,80. Para a variável PI, valores entre 2,4 e 4,0 e para o índice de verde valores entre 50,33 e 58,55. Segundo Bolhàr-Nordenkampf et al. (1989), a relação Fv/Fm pode variar entre 0,75 e 0,85 em plantas que não estão submetidas a estresse. A relação Fv/Fm é utilizada para indicar estresse, quando fatores bióticos ou abióticos alteram a funcionalidade do fotossistema II (FSII) nas plantas. Para a variável PI, segundo Couto et al. (2014), valores de índice fotossintético superior a 0,5 demonstram alta eficiência na maquinaria fotoquímica.

Para as plantas de *E. denticulatum* a relação Fv/Fm apresentou diferença entre os tratamentos com valores inferiores a 0,75 em todos os tratamentos. O maior valor foi observado em 24h (T4) (0,64), seguido de 24h (T3 Controle) (0,59) e 0h (T1 Controle) (0,59), não havendo diferença estatística (Tabela 8). Para a variável índice fotossintético (PI), houve diferença entre os tratamentos com resultados inferiores a 0,5. As maiores médias foram observadas nos tratamentos de 24h (T4) e 24h (T3 controle), com 0,37 e 0,30 respectivamente, não havendo diferença (Tabela 8).

Para a variável Fv/Fm e PI em *E. denticulatum*, foi observado que as condições de estresse podem ser devido a exposição das sementes a sílica-gel associado a exposição a baixas temperaturas em NL. A relação Fv/Fm reduzida observada nas plantas de *E. denticulatum* não foi drástica, não resultando em sintomas visuais de fotoinibição, como clorose, senescência foliar ou morte das plantas. A partir de análises feitas em MEV, foi possível observar que as folhas de *E. denticulatum* tiveram seus estômatos, cutículas e células da epiderme comprometidas. Essas alterações microestruturais podem ter comprometido os aparelhos fotossintéticos das plantas de *E. denticulatum*, causando-lhes estresse fisiológicos durante a fase de cultivo *in vitro*. Casos extremos de fotoinibição são

considerados quando os valores de Fv/Fm se aproximam de zero (Björkman e Demming, 1987).

Tabela 8. Relação Fv/Fm e índice fotossintético (PI) de plantas de *E. denticulatum* provenientes de sementes criopreservadas após 10 meses de cultivo *in vitro*.

Tratamentos	<i>E. denticulatum</i>	
	FV/FM	PI
T1: 0h (Controle 1)	0,59 ab	0,17 bc
T2: 0h + NL (Controle 2)	0,53 b	0,16 c
T3: 24h na sílica-gel (Controle 3)	0,59 ab	0,30 ab
T4: 24h na sílica-gel + NL	0,64 a	0,37 a
Média	0,58	0,25

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey (P≤0,05)

5.1.2.3. Análise de correlação

A matriz de correlação de Pearson permitiu observar a forma como as variáveis estudadas se correlacionaram em plantas de *C. guttata* e *E. denticulatum* obtidas *in vitro*, as quais, foram obtidas a partir de sementes que foram desidratadas em sílica gel sem exposição ao NL (controles) e sementes que foram desidratadas em sílica gel + NL (Figuras 10 e 11).

Com base nos resultados de correlação observados para as duas condições (sílica-gel sem NL e sílica-gel + NL), para *C. guttata*, as variáveis de viabilidade (VIA), germinação (GER) e umidade (UMI), apresentaram correlação positiva forte, com valores entre 0,95 e 0,98. Dessa maneira, quanto maior a umidade, maior a viabilidade e maior a germinação das sementes. Para as duas condições, foi observada correlação negativa forte dessas variáveis com a variável tempo de exposição das sementes a sílica-gel (TEM), com valores entre -0,90 e -0,99. Quanto menor o tempo de exposição das sementes a sílica-gel, maior a viabilidade e germinação das sementes. Como esperado, para a variável umidade, quanto maior o tempo de exposição a sílica-gel, menor a umidade das sementes. Essa condição

afetou negativamente as variáveis de viabilidade e germinação das sementes *in vitro*.

Nas duas condições, foi observada correlação positiva entre a maioria das variáveis biométricas de crescimento. Sendo assim, podemos afirmar que durante o cultivo *in vitro*, essas variáveis não foram afetadas pelo NL.

Em estudo realizado por Taratima et al. (2023), após o cultivo *in vitro* de *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw, todas as variáveis biométricas de crescimento, como número de raiz, comprimento de raiz, número de folhas, comprimento das folhas e massa da matéria fresca e seca, apresentaram correlações significativas positivas entre si. Dessa forma, podemos atribuir a correlação positiva entre as variáveis de crescimento, devido as ótimas condições de cultivo fornecidas pelo cultivo *in vitro*.

Para a variável número de folhas, em plantas obtidas após a criopreservação das sementes, foi observada correlação positiva entre o tempo (0,76) e negativa forte entre as variáveis de viabilidade, germinação e umidade, com valores entre -0,81 e -0,97. Para o número de folhas, o aumento no tempo de exposição das sementes a sílica-gel associado a redução da umidade, contribuiu para um aumento do número de folhas após a criopreservação das sementes. A correlação negativa do número de folhas entre viabilidade e germinação, indica que o uso do NL líquido afetou negativamente essa característica das plantas que foram obtidas *in vitro*. Sendo assim, podemos afirmar que nem sempre a maior viabilidade e germinação das sementes, resultará em plantas com maior número de folhas.

Para as plantas obtidas antes e após a criopreservação, a relação F_v/F_m e índice fotossintético (PI), apresentaram correlação positiva forte, com valores de 0,78 e 0,87 respectivamente.

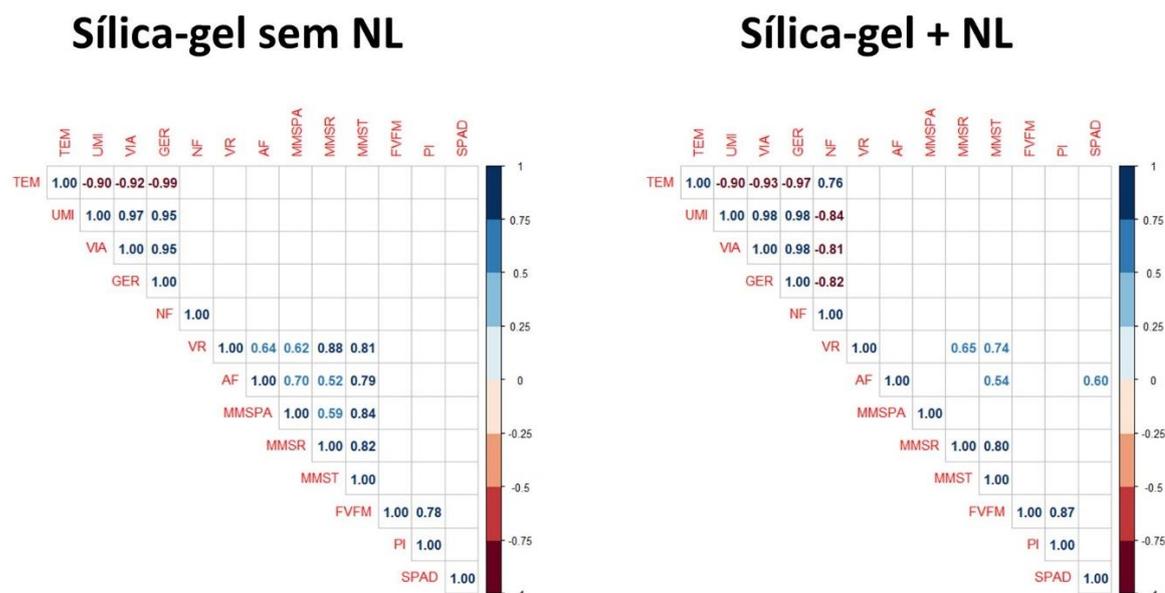


Figura 10. Matriz bivariada - Correlação de Pearson entre características de sementes que foram expostas a sílica-gel e sílica-gel + NL e das plantas obtidas um ano após o semeio *in vitro*. Umidade das sementes (UMI), tempo de exposição das sementes a sílica-gel (TEM), viabilidade (VIA), germinação (GER), número de folhas (NF), área foliar (AF), volume radicular (VR), massa da matéria seca da raiz (MMSR), parte aérea (MMSPA) e total (MMST), índice fotossintético (PI), Fv/Fm (FVFM) e índice de verde (IV) de plantas de *C. guttata*. Vermelho e ajustes ($r = -$) representam correlação negativa e azul representa correlação positiva ao nível de significância $p < 0,05$.

Com base nos resultados de correlação observados para as duas condições (sílica-gel sem NL e sílica-gel + NL), para *E. denticulatum*, as variáveis de viabilidade, germinação e umidade, apresentaram correlação positiva, com valores entre 0,56 e 0,93. Assim como para *C. guttata*, quanto maior a umidade, maior a viabilidade e maior a germinação das sementes. Como esperado, para a variável umidade, quanto maior o tempo de exposição a sílica-gel, menor a umidade das sementes, afetando negativamente nas variáveis de viabilidade e germinação. Porém, com base nos resultados obtidos no item 5.1.1, sabe-se que sementes de *E. denticulatum* são muito mais sensíveis a desidratação em sílica-gel que a espécie *C. guttata*.

Em estudo realizado por Zhang et al. (2015), foi encontrada correlação positiva forte (0,93 ou 0,98) entre viabilidade e germinação *in vitro* de sementes de *Paphiopedilum*. Nesse estudo, a correlação positiva forte entre essas variáveis, está diretamente relacionada ao grau de maturação da semente e a exposição das sementes a agentes escarificantes, como o hipoclorito de sódio. Sendo assim, a

correlação positiva forte para essas variáveis, nas duas condições do presente estudo, pode estar relacionada a maturação das sementes, além disso, as sementes de *C. guttata* e *E. denticulatum*, durante a condução dos experimentos, foram desinfestadas com hipoclorito de sódio.

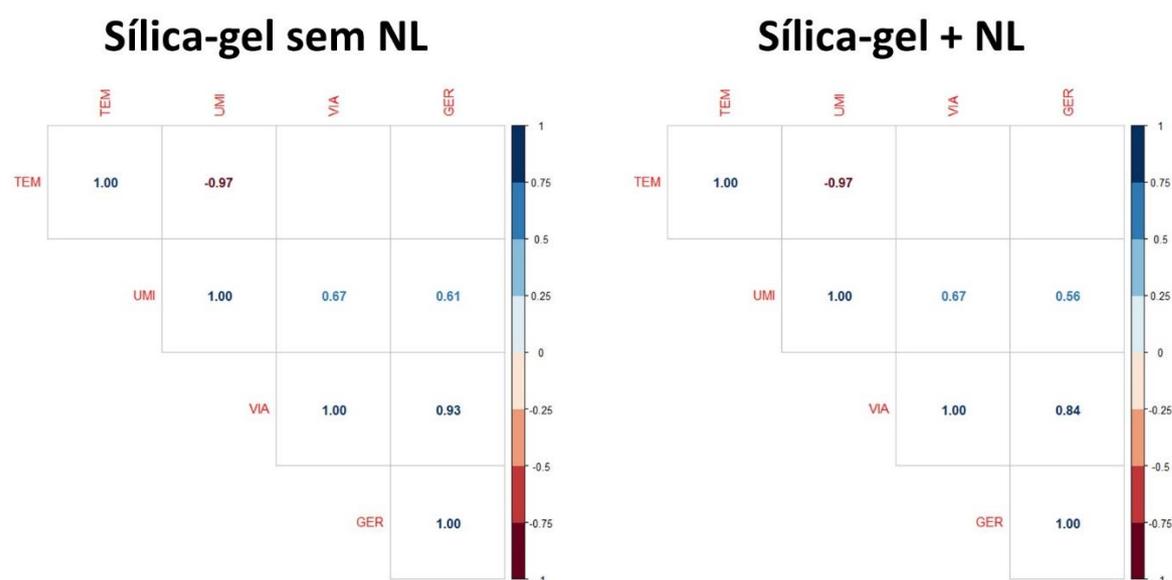


Figura 11. Matriz bivariada - Correlação de Pearson entre características de sementes que foram expostas apenas a sílica-gel e sílica-gel + NL durante o cultivo *in vitro*. Umidade das sementes (UMI), tempo de exposição a sílica-gel (TEM), viabilidade (VI) e germinação (GER) de sementes de *E. denticulatum*. Vermelho e ajustes ($r = -$) representam correlação negativa e azul representa correlação positiva a significância $p < 0,05$.

5.1.2.4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As análises feitas em MEV, mostraram que as células que constituem as faces adaxial e abaxial da epiderme em *C. guttata* apresentam organização e tamanho irregular, as quais, possuem uma camada de cera epicuticular. Os estômatos estão presentes apenas na face abaxial do limbo foliar (hipoestomático), de maneira dispersa e apresentam suas células guardas túrgidas com fenda estomática bem delimitada (Figura 12 A, B e C).

Entre os tratamentos 0h (T1 Controle), 0h + NL (T2) e 30 dias na sílica-gel + NL (T12), não foi observada nenhuma alteração quanto a organização das células na face adaxial das folhas (Figura 12 A, B, D, E, G e H). Entre os tratamentos T1,

T2 e T12, não foi observada nenhuma diferença na face abaxial das folhas (Figura 12 C, F e I).

Quanto a cutícula observada na superfície da epiderme da face adaxial da folha, foram observadas fissuras no tratamento 0h (T2 Controle), correspondendo a plantas provenientes de sementes que foram imersas diretamente no NL (Figura 12 D e E).

Entre os tratamentos 0h (T1 Controle) e 30 dias na sílica-gel + NL (T12) não foi observada qualquer característica distinta em nenhuma das faces das folhas. Com isso, podemos observar que o uso da sílica-gel em sementes criopreservadas após 30 dias, reverteu as alterações microestruturais no tratamento controle em que as sementes foram diretamente expostas ao NL (Fig. 12 G, H e I). A desidratação das sementes de *C. guttata* mesmo a níveis de umidade tão baixo (2,11%), alcançada pelo uso da sílica-gel + NL, após 30 dias, contribuiu para que não ocorressem rupturas na cutícula da epiderme do limbo foliar das plantas obtidas, podendo ser considerada uma característica favorável em plantas durante a fase de aclimatização. Porém, mesmo sendo uma característica favorável em termos microestruturais, a perda de umidade ao longo de 30 dias, de maneira artificial por meio da sílica-gel + NL, em sementes de *C. guttata*, reduziu a viabilidade e germinação das sementes em 38,81% e 67,14%, respectivamente.

Para as plantas de *E. denticulatum* obtidas *in vitro*, as análises feitas em MEV, mostraram que as faces adaxial e abaxial da epiderme apresentaram células alongadas longitudinalmente, possuindo depósitos cristalinos de cera em ambas as faces. Diferente de *C. guttata*, em *E. denticulatum* os estômatos estão concentrados de maneira dispersa nas duas faces, adaxial e abaxial do limbo foliar (anfiestomático). As células guardas dos estômatos apresentam-se túrgidas e com a fenda estomática bem delimitada (Figura 13 A, B e C).

Para *E. denticulatum*, foi observado que os tratamentos 0h (T2 Controle) e 24h na sílica-gel + NL (T4), apresentam características que diferem do tratamento 0h (T1 Controle). No tratamento 0h (T2 Controle), pode-se observar que as células da epiderme das duas faces foram comprimidas, fazendo com que perdessem a sua forma alongada. Não foram observadas diferenças entre os estômatos das duas faces nos tratamentos T1 e T2. Em T4, na face adaxial do limbo foliar, podemos observar que não existe um padrão entre os estômatos, sendo observados estômatos com e sem a sua cavidade estomática bem delimitada

(Figura 13 G e H). Além disso, podem ser observadas fissuras e rompimento da cutícula na epiderme do limbo foliar do mesmo tratamento (Figura 13 I).

A partir das análises feitas em MEV, as folhas das plantas de *E. denticulatum*, apresentaram células com tamanho alterado, estômatos malformados e cutícula comprometida (Fig. 13 D, E, F, G, H e I). A desidratação das sementes em sílica-gel associada ao uso do NL para conservação das sementes de *E. denticulatum*, podem interferir ainda mais na funcionalidade dos estômatos, podendo comprometer a fase de aclimatização das mudas. Segundo Hazarika (2006) e Chandra et al. (2010), plantas oriundas do cultivo *in vitro* possuem estômatos com pouca ou nenhuma funcionalidade e células da epiderme com má formação da cutícula, o que pode acarretar numa redução da sobrevivência das plantas em condições *ex vitro* durante a aclimatização das plantas. Dessa forma, o maior comprometimento dessas estruturas pode ser ainda mais preocupante em termos de conservação, uma vez que a recuperação das plantas após a criopreservação das sementes é extremamente importante.

Os danos causados na superfície das folhas de *C. guttata* e *E. denticulatum* obtidas *in vitro*, podem ser atribuídos a formação de cristais de gelo intracelular após a exposição das sementes ao NL causado pelo excesso de água nas sementes. Para *C. guttata*, a desidratação das sementes contribuiu para que as plântulas obtidas apresentassem características gerais semelhantes ao tratamento controle, no qual as sementes não foram expostas ao NL. Em *E. denticulatum*, a exposição das sementes tanto ao NL como a sílica-gel, resultou no comprometimento de microestruturas, como a má formação da cutícula e dos estômatos. Segundo Sakai et al., (1991), uma das etapas mais importantes na criopreservação é o processo de desidratação, pois visa prevenir danos físicos causados pela formação de cristais de gelo às células durante o processo de congelamento em NL.

Análises biométricas, microscópicas e fisiológicas, comprovaram que mesmo após a obtenção das plantas e o seu crescimento *in vitro*, elas ainda podem apresentar algum estresse causado pela desidratação e criopreservação das sementes em NL. Com isso, este estudo abre caminhos para que novas pesquisas sejam realizadas sobre como sementes de orquídeas devem ser manuseadas para sua conservação em baixas temperaturas. A partir da literatura utilizada, foi possível observar que sementes da mesma espécie se comportam de maneira

distinta quando manuseadas com alta ou baixa umidade. Além disso, conclusões generalistas não devem ser tomadas em estudos de criopreservação para espécies da família Orchidaceae, tendo em vista a grande diversidade de espécies distribuídas em todo o mundo.

5.1.2.5. Estabilidade genética das plantas

Todos os cinco primers ISSR testados (Tabela 3), demonstraram que a imersão direta das sementes em NL ou a desidratação das sementes seguida da imersão em NL, em todos os tratamentos testados para *C. guttata* (T1, T2 e T12) e *E. denticulatum* (T1, T2 e T4), não comprometeu a estabilidade genética das plantas obtidas *in vitro* (Figuras 14 e 15).

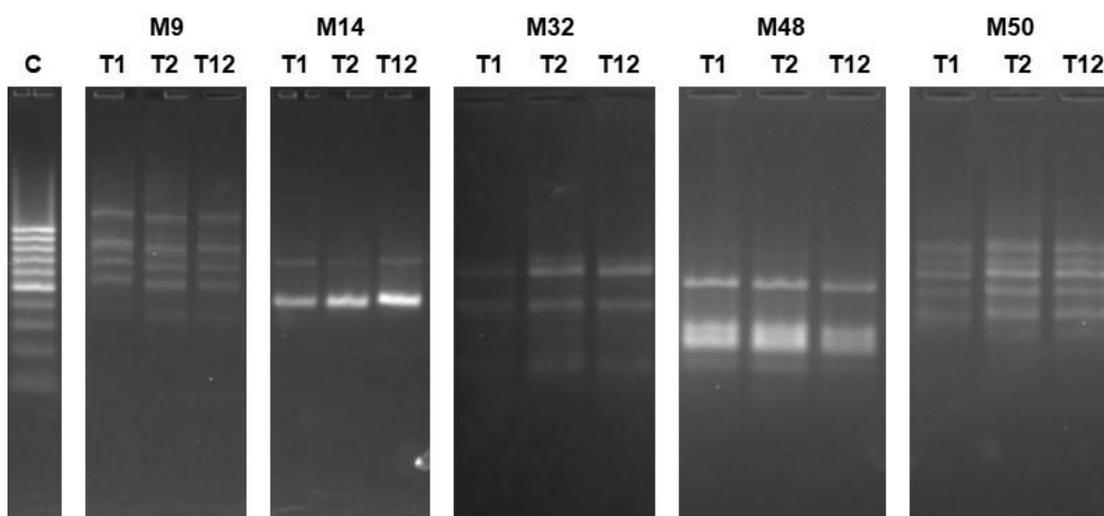


Figura 14. Determinação da estabilidade genética com o uso de cinco marcadores (M) ISSR em plantas de *C. guttata*, após a criopreservação de suas sementes nos seguintes tratamentos: T1: 0h (Controle 1), T2: 0h + NL (Controle 2) e T12: 30 dias na sílica-gel + NL).

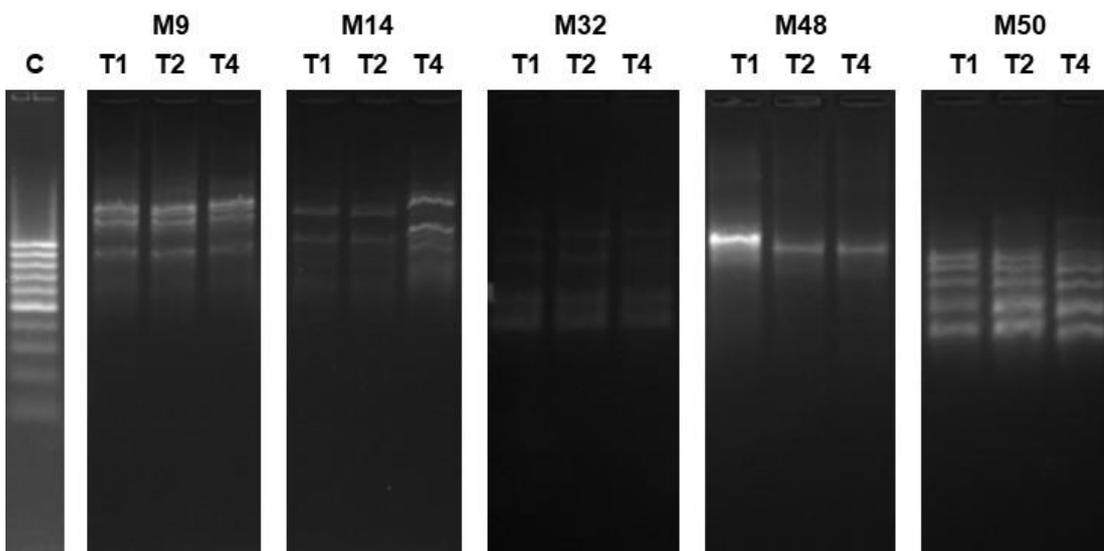


Figura 15. Determinação da estabilidade genética com o uso de cinco marcadores (M) ISSR em plantas de *E. denticulatum*, após a criopreservação de suas sementes nos seguintes tratamentos: T1: 0h (Controle 1), T2: 0h + NL (Controle 2) e T4: 24h na sílica-gel + NL.

Com base na conservação da estabilidade genética das plantas após a criopreservação, sementes de *C. guttata* com umidade inicial entre 56,90% e 41,93%, podem ser imersas diretamente em NL, sem a necessidade de desidratação em sílica-gel, tendo em vista que a desidratação das sementes a níveis muito baixos (2,11%), reduziu a porcentagem de sementes viáveis e germinação *in vitro* em 38,81% e 67,14% respectivamente. Isso é importante ressaltar, uma vez que para conservação, o ideal é que os lotes de sementes apresentem viabilidade e germinação acima de 80%.

Para o *E. denticulatum*, mesmo não sendo observada alteração no DNA das plantas obtidas *in vitro* nos tratamentos testados, a imersão direta das sementes com alta umidade (70,57%) em NL e a desidratação das sementes em sílica-gel, compromete a viabilidade e germinação das sementes *in vitro*. Desse modo, o ideal é que outras técnicas de criopreservação sejam estudadas para essa espécie que não tolera a desidratação física das sementes em sílica-gel. Dentre as técnicas que podem ser investigadas para essa espécie, a vitrificação é uma delas, uma vez que essa técnica é utilizada em explantes que não toleram a perda de água. A técnica tem como objetivo 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).

O uso de marcadores moleculares para determinar a integridade genética de plantas obtidas de sementes maduras criopreservadas, por meio da técnica de vitrificação, foi realizado por Jariyajirawattana e Bunnag (2020), com a espécie *Rhynchosyilis gigantea* (Lindl.) Ridl. e após a obtenção das plantas *in vitro*, o uso de marcadores moleculares do tipo RAPD, comprovou a integridade genéticas das plantas em comparação ao tratamento controle.

Em estudo realizado por Vettorazzi et al. (2019) a criopreservação de sementes do híbrido de *C. harrisoniana* × *C. walkeriana* e das espécies *C. guttata* e *C. tigrina*, por meio da técnica de vitrificação, a análise comparativa de plântulas provenientes de sementes controle e vitrificadas, por meio da citometria de fluxo, indicou que não ocorreu alteração nos níveis de ploidia após a criopreservação, mantendo assim, a estabilidade genética das plantas. O mesmo foi observado por Galdiano Júnior et al. (2013) em sementes maduras de *Oncidium flexuosum* Sims e do híbrido *Dendrobium* 'Dong Yai' (Galdiano Júnior et al., 2014).

Até o momento, o maior uso de marcadores moleculares para determinar a integridade genética de plantas obtidas após a criopreservação, tem sido em estudos de micropropagação (Bhattacharyya et al., 2018; González-Arno et al., 2020; Khor et al., 2020; Tikendra et al., 2021; Burkhan et al., 2022; González-Arno et al., 2022).

5.1.3. Aclimatização das plantas

5.1.3.1. Análises biométricas

A maioria dos estudos com criopreservação de sementes de orquídeas, independente da técnica utilizada, não realiza a aclimatização das mudas obtidas *in vitro*, nesses estudos, a germinação *in vitro* já é considerada suficiente para comprovar ou não a eficiência do método (Nikishina et al. 2001; Hirano et al. 2005). Porém, sabe-se que a aclimatização é considerada um momento crítico do cultivo *in vitro*. Alguns estudos sobre a criopreservação de sementes de orquídeas avaliam apenas a taxa de sobrevivência e fazem análises visuais das plantas (Vendrame et al., 2007; Gardiano et al., 2012; Gardiano et al., 2013; Galdiano et al., 2017). Já em estudo realizado por Vettorazzi et al. (2019), foi comprovada a importância de serem realizadas análises mais detalhadas após a aclimatização das plantas, como por exemplo, análises anatômicas e fisiológicas, que comprovam, de fato, a qualidade das mudas provenientes de sementes que foram criopreservadas.

No presente estudo, após sete meses em condições de casa de vegetação, as plantas aclimatizadas de *C. guttata* e *E. denticulatum*, em musgo esfagno, apresentaram 100% de sobrevivência (Figuras 16 e 17), com aumento das médias para todas as variáveis biométricas avaliadas. Com base na porcentagem de sobrevivência, pode-se observar que os danos causados na superfície das folhas de ambas as espécies, avaliadas em MEV após o cultivo *in vitro*, não comprometeu a aclimatização das plantas (Figura 16 e 17). Segundo Carvalho (1999), a aclimatização consiste em modificações morfo-anatômico-fisiológicas, pelas quais as plantas passam, e que são necessárias para que essas possam sobreviver em um novo ambiente.

Para *C. guttata*, após a aclimatização, foi observado efeito significativo para as variáveis biométricas: área foliar (AF), massa da matéria seca da parte aérea

(MMSPA) e total (MMST). Não foi observado efeito significativo para as variáveis: número de folhas (NF), volume radicular (VR) e massa da matéria seca da raiz (MMSR). Para *E. denticulatum*, houve efeito significativo para todas as variáveis, sendo elas: número de folhas (NF), volume radicular (VR), área foliar (AF), massa da matéria seca da parte aérea (MMSPA), massa da matéria seca da raiz (MMSR) e massa da matéria seca total (MMST).

Para todas as variáveis biométricas de *C. guttata* em que houve efeito significativo, as médias foram agrupadas em dois grupos, com as maiores e menores médias (Tabela 9).

Para a variável área foliar, o grupo com os tratamentos com as maiores médias, apresentaram resultados entre 36,47 (T5: 48h na sílica-gel (Controle 4) e 30,55 (T6: 48h na sílica-gel + NL). No segundo grupo, foram agrupados tratamentos com médias entre 26,57 (T10: 96h na sílica-gel + NL) e 19,76 (T3: 24h na sílica-gel (Controle 3) (Tabela 9).

Para a massa da matéria seca da parte aérea, o grupo com os tratamentos contendo as maiores médias, apresentaram resultados entre 0,47 (T4: 24h na sílica-gel + NL) e 0,34 (T10: 96h na sílica-gel + NL). No segundo grupo, foram agrupados tratamentos com médias entre 0,31 (T2: 0h + NL (Controle 2) e 0,21 (T3: 24h na sílica-gel (Controle 3) (Tabela 9).

Para a massa da matéria seca total, o grupo com os tratamentos contendo as maiores médias, apresentaram resultados entre 0,68 (T4: 24h na sílica-gel + NL) e 0,54 (T8: 72h na sílica-gel + NL). No segundo grupo, foram agrupados tratamentos com médias entre 0,48 (T10: 96h na sílica-gel + NL) e 0,33 (T1: 0h (Controle 1) (Tabela 9).

Diferente das plantas de *C. guttata* obtidas *in vitro*, a fase de aclimatização das plantas favoreceu que essas alcançassem maior uniformidade entre os tratamentos, isso pode ser comprovado pelo número de grupos formados após a análise dos dados, que foram no máximo dois grupos.

Tabela 9. Área foliar (AF), massa da matéria seca da parte aérea (MMSPA) e massa da matéria seca total (MMST) de plantas de *C. guttata* provenientes de sementes criopreservadas após sete meses de aclimatização das plantas

Tratamentos	<i>C. guttata</i>		
	AF	MMSPA	MMST
T1: 0h (Controle 1)	19,99 b	0,22 b	0,33 b
T2: 0h + NL (Controle 2)	26,14 b	0,31 b	0,45 b
T3: 24h na sílica-gel (Controle 3)	19,76 b	0,21 b	0,34 b
T4: 24h na sílica-gel + NL	35,18 a	0,47 a	0,68 a
T5: 48h na sílica-gel (Controle 4)	36,47 a	0,44 a	0,60 a
T6: 48h na sílica-gel + NL	30,55 a	0,38 a	0,58 a
T7: 72h na sílica-gel (Controle 5)	32,76 a	0,38 a	0,56 a
T8: 72h na sílica-gel + NL	31,16 a	0,37 a	0,54 a
T9: 96h na sílica-gel (Controle 6)	25,76 b	0,30 b	0,44 b
T10: 96h na sílica-gel + NL	26,57 b	0,34 a	0,48 b
T11: 30 dias na sílica-gel (Controle 7)	33,24 a	0,39 a	0,57 a
T12: 30 dias na sílica-gel + NL	24,98 b	0,29 b	0,42 b
Média	28,12	0,34	0,50

Médias seguidas da mesma letra, na coluna, pertencem ao mesmo grupo pelo teste Scott-Knott ($P \leq 0,05$).

T1: 0h (Controle 1)

T2: 0h + NL (Controle 2)

T3: 24h na sílica gel (Controle 3)

T4: 24h na sílica + NL

T5: 48h na sílica gel (Controle 4)

T6: 48h na sílica gel + NL

T7: 72h na sílica gel (Controle 5)

T8: 72h na sílica gel + NL

T9: 96h na sílica gel (Controle 6)

T10: 96h na sílica gel + NL

T11: 30 dias na sílica gel (Controle 7)

T12: 30 dias na sílica gel + NL



Figura 16. Plantas de *C. guttata* obtidas *in vitro* após sete meses de aclimatização.

Para a variável número de folhas, em *E. denticulatum*, a maior média foi observada no tratamento de 24h na sílica-gel + NL (T4) (9,13), diferindo apenas do tratamento de 0h + NL (T2 Controle 2) (6,60) (Tabela 10).

Para variável volume radicular, a maior média foi obtida no tratamento 24h na sílica-gel (Controle 3) (T3) (1,83), diferindo apenas do tratamento de 0h + NL (T2 Controle 2) (0,75) (Tabela 10).

Para a espécie *E. denticulatum*, em todas as variáveis em que houve efeito significativo, as menores médias foram observadas no tratamento em que as sementes apresentaram maior umidade e que foram expostas diretamente ao NL (T2: 0h + NL (Controle 2) (Tabela 10). Assim, podemos observar que o NL não é benéfico para as plantas, o qual comprometeu todas as características biométricas das plantas da fase *in vitro*, até a fase de aclimatização nesse tratamento controle (T2). Isso pode ser atribuído a umidade inicial das sementes (70,53%), que pode ter levado a danos intracelulares causados pela formação de cristais de gelo durante a criopreservação, os quais, acabaram comprometendo o crescimento das plantas nas duas etapas de cultivo.

Tabela 10. Número de folhas (NF), volume radicular (VR), área foliar (AF), massa da matéria seca da parte aérea (MMSPA), massa da matéria seca da raiz (MMSR) e massa da matéria seca total (MMST) de plantas de *E. denticulatum* provenientes de sementes criopreservadas após sete meses de aclimatização.

Tratamentos	<i>E. denticulatum</i>		
	NF	VR	AF
T1: 0h (Controle 1)	8,80 a	1,33 ab	25,91 a
T2: 0h + NL (Controle 2)	6,60 b	0,75 b	13,05 b
T3: 24h na sílica-gel (Controle 3)	7,40 ab	1,83 a	22,60 a
T4: 24h na sílica-gel + NL	9,13 a	1,41 a	26,32 b
Média	7,89	1,33	21,97

Tratamentos	<i>E. denticulatum</i>		
	MMSPA	MMSR	MMST
T1: 0h (Controle 1)	0,19 a	0,12 a	0,31 a
T2: 0h + NL (Controle 2)	0,09 b	0,04 b	0,13 b
T3: 24h na sílica-gel (Controle 3)	0,20 a	0,13 a	0,33 a
T4: 24h na sílica-gel + NL	0,22 a	0,13 a	0,36 a
Média	0,17	0,10	0,28

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$).

Todas as plantas de *C. guttata* e de *E. denticulatum* que foram aclimatizadas, apresentaram aspecto morfológico de plantas normais, com raiz e parte aérea bem desenvolvidas.

5.1.3.2. Análises fisiológicas

Para *C. guttata*, após a aclimatização, foi observado efeito significativo para variável fisiológica: relação Fv/Fm (FV/FM). Não foi observado efeito significativo para as variáveis índice fotossintético (PI) e índice de verde (IV). Para *E. denticulatum* não foi observado efeito significativo para as variáveis: relação Fv/Fm (FV/FM), índice fotossintético (PI) e índice de verde (IV).

Para a variável fisiológica em que houve efeito significativo, para *C. guttata*, as médias foram agrupadas em dois grupos, com as maiores e menores médias (Tabela 11).

Para *C. guttata*, a variável fisiológica Fv/Fm, os tratamentos agrupados entre aqueles com as maiores médias, apresentaram valores entre 0,82 (T3: 24h na sílica-gel (Controle 3) e 0,81 (T9: 96h na sílica-gel (Controle 6) e as menores médias entre 0,81 (T2: 0h + NL (Controle 2) e 0,80 (T10: 96h na sílica-gel + NL) (Tabela 11). Apesar de ser observada diferença entre os tratamentos, as médias obtidas caracterizam plantas que não estão sob condição de estresse. De acordo com Bolhàr-Nordenkampf et al. (1989), a relação Fv/Fm pode variar entre 0,75 e 0,85 em plantas não submetidas a estresse. A relação Fv/Fm é usada como indicador de estresse, quando fatores bióticos ou abióticos alteram a funcionalidade do fotossistema II (FSII).

Para *C. guttata*, o índice fotossintético apresentou valores entre 5,84 e 9,90, dentro da faixa que indica plantas que não estão sob condição de estresse, e o índice de verde apresentou resultados entre 46,65 e 51,10, valores inferiores aos obtidos após o cultivo *in vitro*, no entanto, isso não influenciou no desenvolvimento das plantas durante a fase de aclimatização.

Tabela 11. Relação Fv/Fm de plantas de *C. guttata* provenientes de sementes criopreservadas após sete meses de aclimatização.

Tratamentos	<i>C. guttata</i>
	Fv/Fm
T1: 0h (Controle 1)	0,82 a
T2: 0h + NL (Controle 2)	0,81 b
T3: 24h na sílica-gel (Controle 3)	0,82 a
T4: 24h na sílica-gel + NL	0,80 b
T5: 48h na sílica-gel (Controle 4)	0,81 a
T6: 48h na sílica-gel + NL	0,82 a
T7: 72h na sílica-gel (Controle 5)	0,82 a
T8: 72h na sílica-gel + NL	0,82 a
T9: 96h na sílica-gel (Controle 6)	0,81 a
T10: 96h na sílica-gel + NL	0,80 b
T11: 30 dias na sílica-gel (Controle 7)	0,81 a
T12: 30 dias na sílica-gel + NL	0,80 b
Média	0,81

Médias seguidas da mesma letra, na coluna, pertencem ao mesmo grupo pelo teste Scott-Knott ($P \leq 0,05$).

Para *E. denticulatum*, os valores observados para a relação Fv/Fm ficaram entre 0,75 e 0,77 e para a variável PI, os valores ficaram entre 2,45 e 4,05. Esses valores indicam que após a aclimatização, as plantas não estavam sob condições de estresse, diferente das plantas obtidas após a fase de cultivo *in vitro*, as quais, apresentaram valores de Fv/Fm entre 0,64 e 0,59, e de PI entre 0,37 e 0,30. Segundo Moraes et al. (2002), a aclimatização é considerada como o momento mais crítico do cultivo *in vitro*, e para o seu sucesso, é necessário que as plantas em aclimatização estejam em um substrato que lhes propiciem boas condições para seu melhor desenvolvimento. Dessa forma, podemos afirmar que a espécie *E. denticulatum*, durante a fase de aclimatização, adequou-se muito bem as novas condições de cultivo em casa de vegetação, uma vez que os valores de Fv/Fm e PI, estavam dentro da faixa que indica que as plantas não estão sob condição de estresse. Sendo assim, nem sempre as condições de cultivo *in vitro* são as mais adequadas para algumas espécies, como foi o caso do *E. denticulatum*. Esse

mesmo comportamento foi observado em estudo realizado por Vettorazzi et al. (2019).

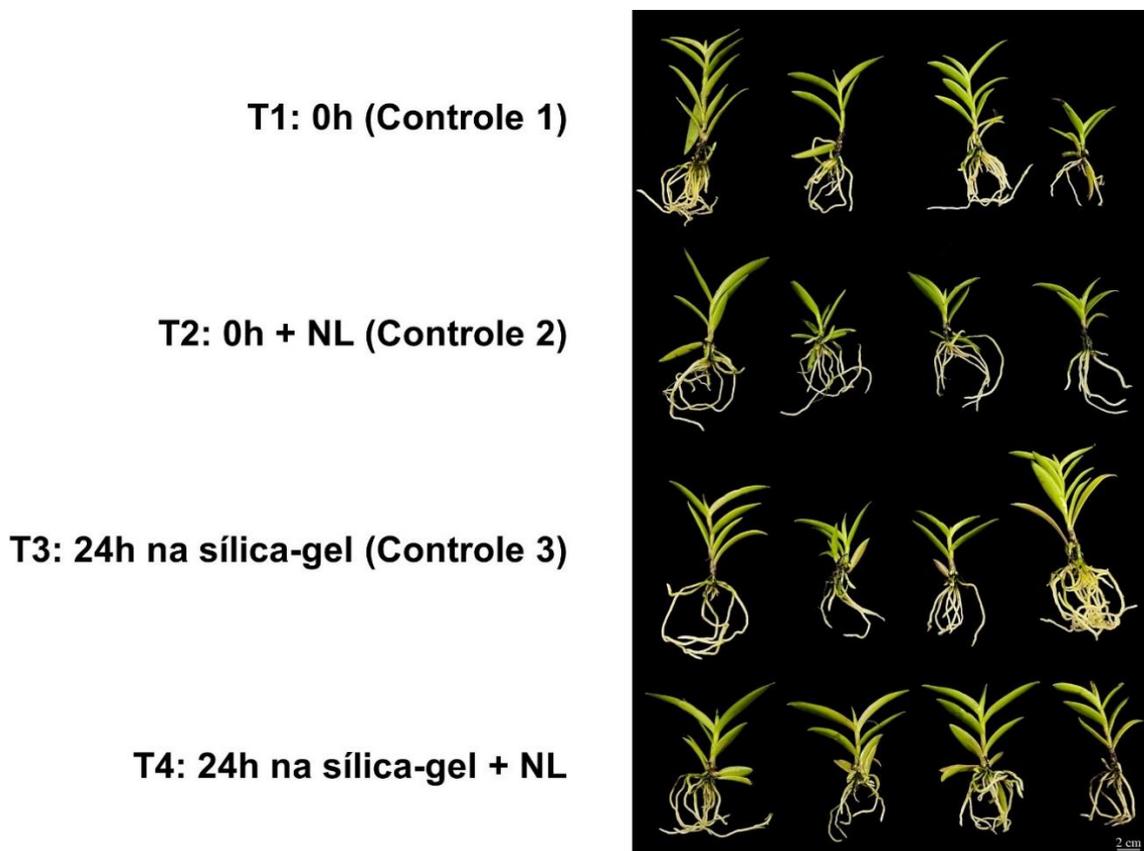


Figura 17. Plantas de *E. denticulatum* obtidas *in vitro* após sete meses de aclimatização.

5.1.3.3. Análise de correlação

A matriz de correlação de Pearson permitiu observar a forma como as variáveis estudadas se correlacionaram em plantas de *C. guttata* após sete meses de aclimatização em casa de vegetação, as quais foram obtidas a partir de sementes criopreservadas em NL, com diferentes umidades, por meio da desidratação em sílica-gel durante diferentes tempos (Figura 18). Não foram obtidos dados suficientes para realizar a análise de correlação para a espécie *E. denticulatum*.

Com base nos resultados de correlação observados para as duas condições (sílica-gel sem NL e sílica-gel + NL), após a aclimatização de *C. guttata*, houve

correlação negativa forte entre tempo e umidade (-0,90). Assim, podemos observar que mesmo após a aclimatização, as plantas ainda sofrem influência desses fatores (Figura 18).

Para as plantas que foram obtidas a partir de sementes expostas apenas a sílica-gel, foi observado que a variável umidade, não apresentou efeito significativo com nenhuma outra variável. Já para as plantas aclimatizadas que foram obtidas após a desidratação e criopreservação das sementes em NL, a umidade apresentou correlação positiva entre todas as variáveis biométricas analisadas, com exceção do número de folhas. Isso apenas confirma o quanto o fator umidade é crucial em estudos de criopreservação, uma vez que no presente estudo, o NL esteve diretamente correlacionado com as características biométricas que determinam a qualidade das plantas.

Para os resultados de correlação das características fisiológicas, sementes que foram desidratadas e criopreservadas em NL, a correlação entre Fv/Fm e PI, foi positiva forte (0,90). As variáveis Fv/Fm e PI são variáveis que interagem entre si, e quanto maior os seus valores, maior a qualidade fisiológica dessas plantas (Jiang et al., 2006; Christen et al., 2007; Stirbet e Govindje, 2011). Dessa forma, podemos observar que a desidratação das sementes seguida da criopreservação em NL, não afetou a qualidade fisiológica das plantas após a aclimatização.

Para a criopreservação de germoplasma, é particularmente importante que o material criopreservado produza plantas idênticas ao fenótipo original (Dumet e Benson, 2000). Neste trabalho, todas as plantas de *C. guttata* e *E. denticulatum* que foram aclimatizadas, obtidas após a criopreservação das sementes por meio da técnica de desidratação em sílica-gel, apresentaram aspecto morfológico e fisiológico de plantas normais, com raiz e parte aéreas bem desenvolvidas. Além disso, as análises feitas por meio do uso de marcadores moleculares, comprovaram que as regiões do DNA que foram analisadas, não apresentaram diferenças entre aquelas plantas que foram provenientes de sementes criopreservadas e aquelas do tratamento controle.

Diferentes respostas obtidas de acordo com o teor de água das sementes reforçam a necessidade da investigação sobre o comportamento dos diversos gêneros de orquídeas durante a criopreservação em NL (Merritt et al., 2014). Com isso, a realização de maior número de ensaios em diferentes espécies de orquídeas do gênero *Cattleya* e *Epidendrum*, permitirá que possamos compreender as

características que estão ligadas a tolerância das sementes a desidratação, e também a exposição dessas sementes a temperaturas ultrabaixas em NL.

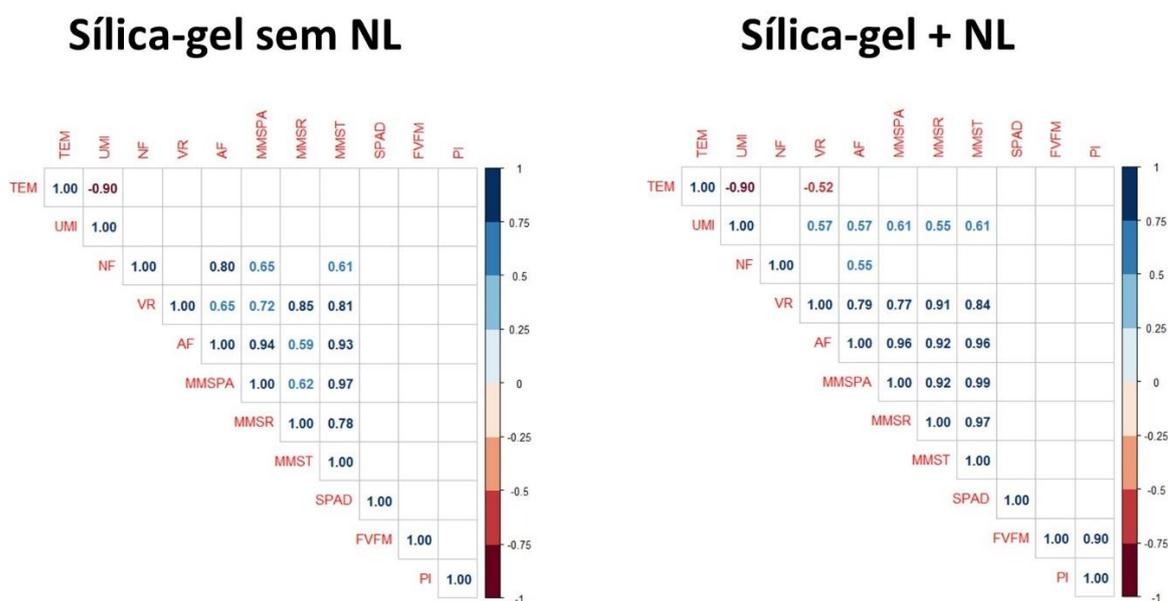


Figura 18. Matriz bivariada - Correlação de Pearson entre características de plantas após sete meses de aclimatização, provenientes de sementes que foram expostas a sílica-gel e sílica-gel + NL. Umidade das sementes (UMI), tempo de exposição das sementes a sílica-gel (TEM), viabilidade (VI), germinação (GER), número de folhas (NF), área foliar (AF), volume radicular (VR), massa da matéria seca da raiz (MMSR), parte aérea (MMSPA) e total (MMST), índice fotossintético (PI), Fv/Fm (FVFM) e índice de verde (IV) de plantas de *C. guttata*. Vermelho e azules (r= -) representam correlação negativa e azul representa correlação positiva ao nível de significância $p < 0,05$.

6. CONCLUSÕES

Sementes de *C. guttata* com umidade entre 41,93% e 56,90% podem ser imersas diretamente em NL sem a necessidade de desidratação em sílica-gel.

Sementes de *E. denticulatum* não toleram a desidratação em sílica-gel seguida da criopreservação em NL, dessa forma, outras técnicas de criopreservação devem ser utilizadas para investigar a conservação dessa espécie.

De modo geral, a desidratação em sílica-gel reduz a viabilidade e a germinação das sementes de *C. guttata* e *E. denticulatum* com alta umidade inicial.

Quanto ao desenvolvimento das plantas *in vitro*, o uso da técnica de desidratação em sílica-gel, para a criopreservação de sementes de *C. guttata*, não comprometeu as características fisiológicas das plantas obtidas *in vitro*. Já para *E. denticulatum*, houve o comprometimento das características fisiológicas.

A desidratação não comprometeu as características microestruturais das folhas em *C. guttata* após o cultivo *in vitro*. Em *E. denticulatum*, foram observadas alterações microestruturais significativas após a desidratação e exposição das sementes ao NL.

Após a desidratação e criopreservação das sementes, a estabilidade genética das plantas obtidas *in vitro* de *C. guttata* e *E. denticulatum*, foram preservadas.

Ao fim da aclimatização, as plantas obtidas *in vitro* após a criopreservação das sementes por meio da técnica de desidratação em sílica-gel, apresentaram fenótipos, características fisiológicas e morfologia de plantas normais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALHO, C. J. (2020) Hydropower dams and reservoirs and their impacts on Brazil's biodiversity and natural habitats: a review. *World Journal of Advanced Research and Reviews*, 6(3): 205-215.
- 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.
- ARDITTI, J., GHANI, A.K. A. (2000) Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. *New Phytologist*. 367-421.
- BAIRU, M.W., AREMU, A.O., VAN STADEN, J. (2011) Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. *Plant Growth Regulation*, 63: 147-173.
- 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: 26 Jul. 2022.
- BENELLI, C. (2021) Plant cryopreservation: A look at the present and the future. *Plants*, 10(12): 2744.

- BETTONI, J.C., WANG, M.R.E., WANG, Q.C. (2024) Regeneração *in vitro*, Micropropagação e Conservação de Germoplasma de Plantas Hortícolas. *Horticulturae*, 10 (1): 45.
- BHATIA, R., SINGH, K.P., SHARMA, T.R., JHANG, T. (2011) Evaluation of the genetic fidelity of *in vitro*-propagated gerbera (*Gerbera jamesonii* Bolus) using DNA-based markers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 104(1): 131-135.
- BHATTACHARYYA, P., KUMAR, V., VAN STADEN, J. (2018) *In vitro* encapsulation based short term storage and assessment of genetic homogeneity in regenerated *Ansellia africana* (Leopard orchid) using gene targeted molecular markers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 133, 299-310.
- BHATTACHARYYA, P., KUMARIA, S., DIENGDOH, R., TANDON, P. (2014) Genetic stability and phytochemical analysis of the *in vitro* regenerated plants of *Dendrobium nobile* Lindl., an endangered medicinal orchid. *Meta gene*, 2: 489-504.
- BHOWMIK, T.K., RAHMAN, M.M. (2020) *In vitro* mass scale propagation and seedlings development of medicinal orchid *Dendrobium transparens* Wall ex Lindl. *Journal of Medicinal Plant Studies*, 8(3): 141-146.
- BJÖRKMAN, O., DEMMING, B. (1987) Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77K among vascular plants of diverse origins. *Planta*, 170: 489-504.
- BOLHÀR-NORDENKAMPF, H.R., LONG, S.P., BAKER, N.R., ÖQUIST, G., SCHREIBERS, 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.
- BULPITT, C.J. (2005) The uses and misuses of orchids in medicine. *An International Journal of Medicine*, 98:625-631.
- BURKHAN, H., RAJAN, K.S., APPALASAMY, S., POOBATHY, R., CHEW, B.L., MARIAPPAN, V., SUBRAMANIAM, S. (2022) Effect of Cryopreservation Method Supported with Biochemical Analyses in the Axillary Bud of Jewel Orchid, *Ludisia discolor*. *Plants*, 11(7): 879.

- CAMERON, K.M., CHASE, M.W., WHITTEN, W.M., KORES, P.J., JARRELL, D.C., ALBERT, V.A., GOLDMAN, D.H. (1999) A phylogenetic analysis of the Orchidaceae: evidence from rbcL nucleotide sequences. *American Journal of Botany*, 86(2): 208-224.
- CARDOSO, J.C. (2012) *Dendrobium* 'Brazilian Fire 101' - New option of color of flowers for the orchid market. *Horticultura Brasileira*, 30(3): 561-564.
- CARDOSO, J.C. (2017) *Ionocidium* 'Cerrado 101': intergeneric orchid hybrid with high quality of blooming. *Ornamental Horticulture*, 23(3): 351-356.
- CARDOSO, J.C., MARTINELLI, A.P., TEIXEIRA D.A, J.A. (2016) A novel approach for the selection of *Cattleya* hybrids for precocious and season-independent flowering. *Euphytica*, 210(1): 143-150.
- CARDOSO, J.C., ZANELLO, C.A., CHEN, J.T. (2020) An overview of orchid protocorm-like bodies: Mass propagation, biotechnology, molecular aspects, and breeding. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3): 985.
- CARVALHO, G.R. (1999) Aclimatização de plantas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) propagadas "in vitro". *Ciência e Agrotecnologia*, 23(3): 483-490.
- CASTRO, F.A., CAMPOSTRINI, E., TORRES NETTO, A.T., VIANA, L.H. (2011) Relationship between photochemical efficiency (JIP-Test Parameters) and portable chlorophyll meter readings in papaya plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 23(4): 295- 304.
- CERNA, M., VALDIVIESO, P., CELLA, R., MÁTYÁS, B., AUCAPIÑA, C. (2018) Cryopreservation of orchid seeds through rapid and step freezing methods. *F1000Research*, 7(209): 1-12.
- CHAIPANICH, V.V., ROBERTS, D.L., YENCHON, S., TE-CHATO, S., DIVAKARAN, M. (2019) Development of a cryopreservation protocol for *Vanilla siamensis*: an endangered orchid species in Thailand. *Cryoletters*, 40(5): 305-311.
- CHANDRA, S., BANDOPADHYAY, R., KUMAR, V. CHANDRA, R. (2010) Acclimatization of tissue cultured plantlets: from laboratory to land. *Biotechnology Letters*, 32: 1199-1205.

- CHASE, M.W., CAMERON, K.M., FREUDENSTEIN, J.V., PRIDGEON, A.M., SALAZAR, G., VAN DEN BERG, C., SCHUITEMAN, A. (2015) An updated classification of Orchidaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 177(2): 151-174.
- 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.
- CHRISTENHUSZ, M.J., BYNG, J.W. (2016) The number of known plants species in the world and its annual increase. *Phytotaxa*, 261(3): 201-217.
- COELHO, S.V.B., ROSA, S.D.V.F.D., FANTAZZINI, T.B., BAUTE, J.L., SILVA, L.C. (2018) Cryopreservation in *Coffea canephora* Pierre seeds: Slow and fast cooling. *Ciência e Agrotecnologia*, 42 (6): 588-597.
- CORDOVA, I.I.L.B., THAMMASIRI, K. (2016) Cryopreservation on a cryo-plate of *Arundina graminifolia* protocorms, dehydrated with silica gel and drying beads. *CryoLetters*, 37(2): 68-76.
- COUTO, T. R. D., SILVA, J. R. D., NETTO, A. T., CARVALHO, V. S., CAMPOSTRINI, E. (2014) Eficiência fotossintética e crescimento de genótipos de abacaxizeiro cultivados *in vitro* em diferentes qualidades de luz, tipos de frasco de cultivo e concentrações de sacarose. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 36: 459-466.
- DAS, M.C., DEVI, S.D., KUMARIA, S., REED, B.M. (2021). Looking for a way forward for the cryopreservation of orchid diversity. *Cryobiology*, 102: 1-14.
- DAVENPORT, T.R., NDANGALASI, H.J. (2003) An escalating trade in orchid tubers across Tanzania's Southern Highlands: assessment, dynamics and conservation implications. *Oryx*, 37(1): 55-61.
- DIAMOND, J.M. (1989) The present, past and future of human-caused extinctions. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 325: 469-476.
- DOLCE, N.R., MEDINA, R.D., TERADA, G., GONZÁLEZ-ARNAO, M.T., FLACHSLAND, E.A. (2020) *In vitro* propagation and germplasm conservation

of wild orchids from South America. *Orchid biology: recent trends & challenges*, 37-94.

DOYLE, J.J., DOYLE J.L. (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12: 13-15.

DRESSLER, R.L. (1981) *The Orchids: natural history and classification*. Harvard University Press. Cambridge, Massachusetts. 332 p

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.

ELIAS, M., MCKEY, D., PANAUD, O., ANSTETT, M.C., ROBERT, T. (2001) Traditional management of cassava morphological and genetic diversity by the Makushi Amerindians (Guyana, South America): Perspectives for on-far conservation of crop genetic resources. *Euphytica*, 120(1):143-157.

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: 5-16.

ENGELMANN, F., GONZALEZ-ARNAO, 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.

FATAHI, M., VAFAEE, Y., TAHIR, N.A.R., KHORSHIDI, J. (2022) Large-scale *in vitro* multiplication and phytochemical analysis of *Himantoglossum affine* (Boiss.) Schltr.: an endangered Euro-Mediterranean terrestrial Orchid. *Diversity*, 14(12): 1137.

- FERRARI, E.A.P., COLOMBO, R.C., FARIA, R.T.D., NEVES, C.S.V.J., VERO, F.D.S. (2020) Degree of moisture in seeds for the cryopreservation of orchids native to Brazil. *Ciência Rural*, 50(8): 1-7.
- FERREIRA, D.F. (2011) Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*, 35(6): 1039-1042.
- GALDIANO, R.F., 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 bBiotechnology*, 172(5): 2521-2529.
- 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.
- GIRI, L., JUGRAN, A., RAWAT, S., DHYANI, P., ANDOLA, H., BHATT, I.D., RAWAL, R.S., DHAR, U. (2012) *In vitro* propagation, genetic and phytochemical assessment of *Habenaria edgeworthii*: an important Astavarga plant. *Acta Physiologiae Plantarum*, 34: 869-875.
- GIVNISH, T.J., SPALINK, D., AMES, M., LYON, S.P., HUNTER, S.J., ZULUAGA, A., ENDARA, L. (2015) Orchid phylogenomics and multiple drivers of their extraordinary diversification. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, (282)1814: 20151553.
- GONZÁLEZ-ARNAO, M.T., CRUZ-CRUZ, C.A., HERNÁNDEZ-RAMÍREZ, F., ALEJANDRE-ROSAS, J.A., HERNÁNDEZ-ROMERO, A.C. (2022) Assessment of vegetative growth and genetic integrity of *Vanilla planifolia* regenerants after cryopreservation. *Plants*, 11(13): 1630.
- GONZÁLEZ-ARNAO, M.T., HERNÁNDEZ-RAMÍREZ, F., DOLCE, N.R., RASCÓN-DÍAZ, M.P., CRUZ-CRUZ, C.A. (2020) Cryobiotechnological studies in *Vanilla*:

- The orchid of multi-industrial uses. *Orchid Biology: Recent Trends & Challenges*, 21-35.
- GOWTHAMI, R., CHANDER, S., PANDEY, R., SHANKAR, M., AGRAWAL, A. (2023) Desenvolvimento de protocolo de crioconservação por vitrificação de gotículas eficiente e sustentável para pontas de brotos para conservação a longo prazo de germoplasma de Dália. *Scientia Horticulturae*, 321, 112329.
- 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.
- HAZARIKA, B. N. (2006) Morphophysiological disorders in *in vitro* cul-ture of plants. *Scientia Horticulturae*, 108: 105-120.
- HEBERLÊ. D. (2023) Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia: Brasil ganha primeiro banco de germoplasma de baunilhas. https://www.embrapa.gov.br/web/portal/recursos-geneticos-e-biotecnologia/busca-de-noticias/-/noticia/72142965/brasil-ganha-primeiro-banco-de-germoplasma-de-baunilhas?p_auth=dCGglmqI em 12/11/2023.
- HINSLEY, A., DE BOER, H.J., FAY, M.F., GALE, S.W., GARDINER, L.M., GUNASEKARA, R.S., PHELPS, J. (2018) A review of the trade in orchids and its implications for conservation. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 186(4): 435-455.
- HIRANO, T., GODO, T., MII, M., ISHIKAWA, K. (2005) Cryopreservation of immature seeds of *Bletilla striata* by vitrification. *Plant Cell Reports*, 23: 534-539.
- HIRANO, T., GODO, T., MIYOSHI, K., ISHIKAWA, K., ISHIKAWA, M., MII, M. (2009) Cryopreservation and low-temperature storage of seeds of *Phaius tankervilleae*. *Plant Biotechnology Reports*, 3(1): 103-109.
- IMSOMBOON, T., THAMMASIRI, K., KOSIYACHINDA, P., CHUENBOONNGARM, N., PANVISAVAS, N. (2020) Cryopreservation of Protocorm-like Bodies of *Vanda lilacina* Teijsm. & Binn., a Thai Orchid Species, by V-cryo-plate and D-

- cryo-plate Methods. *Walailak Journal of Science and Technology (WJST)*, 17(4): 369-379.
- 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*, 128-136.
- JARIYAJIRAWATTANA, D., BUNNAG, S. (2020) The effects of vitrification method on the seed survival and genetic stability of *Rhynchostylis gigantea* (Rindl.) Lidl. *Asia-Pacific Journal of Science and Technology*, 25(03): 1-9.
- JARIYAJIRAWATTANA, D., BUNNAG, S. (2020) The effects of vitrification method on the seed survival and genetic stability of *Rhynchostylis gigantea* (Rindl.) Lidl. *Asia-Pacific Journal of Science and Technology*, 25(03): 1-9.
- 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.
- JOHNSON, S.D., EDWARDS, T.J. (2000) The structure and function of orchid pollinaria. *Plant Systematics and Evolution*, 222(1-4): 243-269.
- JOSHI, P.R., PANDEY, S., MAHARJAN, L., PANT, B. (2023) Micropropagation and assessment of genetic stability of *Dendrobium transparens* Wall. Ex Lindl. using RAPD and ISSR markers. *Frontiers in Conservation Science*, 3, 1083933.
- 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.
- KARTHA, K.K. (1985) Meristem culture and germplasm preservation. In: Kartha, K.K. (Ed.) *Cryopreservation of plant cells and organs*. Boca Raton, Florida, CRC Press, p. 115-134.
- KHOR, S.P., YEOW, L.C., POOBATHY, R., ZAKARIA, R., CHEW, B.L., SUBRAMANIAM, S. (2020) Droplet-vitrification of *Aranda Broga* Blue orchid:

- Role of ascorbic acid on the antioxidant system and genetic fidelity assessments via RAPD and SCoT markers. *Biotechnology reports*, 26, e00448.
- KIM, Y.K., JO, S., CHEON, S.H., KWAK, M., KIM, Y.D., KIM, K.J. (2020) Plastome evolution and phylogeny of subtribe Aeridinae (Vandaeae, Orchidaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 144: 106721.
- 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.
- LIU, F., HUANG, L., LI, Y., REINHOUD, P., JONGSMA, M. A., WANG, C. (2011) Shoot organogenesis in leaf explants of *Hydrangea macrophylla* "Hyd1" and assessing genetic stability of regenerants using ISSR markers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 104(1): 111-117.
- 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.
- LU, H., LIU, Z., LAN, S. (2019) Genome Sequencing Reveals the Role of MADS-box Gene Families in the Floral Morphology Evolution of Orchids. *Horticultural Plant Journal*, 5(6): 247-254.
- MAZUR, P. (1984) Freezing of living cells: mechanisms and implications. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 247(3): 125-142.
- MELO, M.C., BORBA, E.L. (2011) Morphological variability in rupicolous species of the *Acianthera prolifera* complex (Orchidaceae) occurring in southeastern Brazil. *Plant Systematics and Evolution*, 293: 135-145.
- 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.
- MORAES, L.M., CAVALVANTE, L.C.D., FARIA, R.T. (2002) Substratos para aclimatização de *Dendrobium nobile* Lindl (Orchidaceae) propagadas *in vitro*. *Acta Scientiarum*, 24(5): 1397-1400.

- MURASHIGE, T., SKOOG, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3): 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) Effect of cryoconservation on seed germination of rare tropical orchids. *Russian Journal of Plant Physiology*, 48: 810-815.
- 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.
- PANT, B. (2013) Medicinal orchids and their uses: tissue culture a potential alternative for conservation. *African Journal of Plant Science*, 7: 448-467.
- PAULA, J.C.B.D., BERTONCELLI, D.J., ALVES, G.A.C., MEN, G.B., MATHIAS, T.F., FARIA, R.T.D. (2018) Cryoprotectant solutions in star orchid seeds and bamboo orchid conservation in liquid nitrogen. *Ornamental Horticulture*, 24(4): 341-346.
- PHELPS, J., WEBB, E.L. (2015) "Invisible" wildlife trades: Southeast Asia's undocumented illegal trade in wild ornamental plants. *Biological Conservation*, 186: 296-305.
- PHILLIPS, R.D., DIXON, K.W., PEAKALL, R. (2012) Low population genetic differentiation in the Orchidaceae: implications for the diversification of the family. *Molecular Ecology*, 21: 5208-5220
- PIRONDINI, A., SGARBI, E. (2014) Effect of cryopreservation on *in vitro* seed germination and protocorm growth of Mediterranean orchids. *CryoLetters*, 35(4): 327-335.
- POINAR, G., RASMUSSEN, F.N. (2017) Orchids from the past, with a new species in Baltic amber. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 183 3: 327-333.

- POPOVA, E., KULICHENKO, I. KIM, H.H (2023) Papel crítico das condições de regeneração na pós-criopreservação de germoplasma vegetal *in vitro*. *Biologia*, 12 (4): 542.
- PRADA, J.A., AGUILAR, M.E., ABDELNOUR-ESQUIVEL, A., ENGELMANN, F. (2015) Cryopreservation of Seeds and Embryos of *Jatropha curcas* L. *American Journal of Plant Sciences*, 6 (01): 172.
- PRADHAN, S., PAUDEL, Y.P., QIN, W., PANT, B. (2023) Genetic fidelity assessment of wild and tissue cultured regenerants of a threatened orchid, *Cymbidium aloifolium* using molecular markers. *Plant Gene*, 34, 100418.
- PRITCHARD H.W, POYNTER L.C, SEATON P.T. (1999) Interspecific variation in orchid seed longevity in relation to ultra-dry storage and cryopreservation. *Lindleyana*, 14: 92-101.
- PRITCHARD, H.W. (1984) Liquid nitrogen preservation of terrestrial and epiphytic orchid seeds. *CryoLetters*, 5: 295-300.
- 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.
- RADZAN, M.K. (2003) Introduction to plant tissue culture. 2^a ed. *Enfield: Science Publishers*, p. 287-306.
- RAMÍREZ, S.R., GRAVENDEEL, B., SINGER, R.B., MARSHALL, C.R., PIERCE, N.E., (2007) Dating the origin of the Orchidaceae from a fossil orchid with its pollinator. *Nature*, (448)7157: 1042-1045.
- REITER, N., WHITFIELD, J., POLLARD, G. (2016) Orchid re-introductions: an evaluation of success and ecological considerations using key comparative studies from Australia. *Plant Ecology*, 217: 1-15.
- REN, R., ZHOU, H., ZHANG, L., JIANG, X., ZHANG, M., LIU, Y. (2022) ROS-induced PCD affects the viability of seeds with different moisture content after cryopreservation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 148(3): 623-633.

- 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.
- SEATON, P.T., HAILES, N.S.J. (1989) Effect of temperature and moisture content on the viability of *Cattleya aurantiaca* seed. *Modern methods in orchid conservation: the role of physiology, ecology and management*, 17-29.
- SEATON, P.T., PRITCHARD, H.W. (2003) Orchid germplasm collection, storage and exchange, in: K.W. DIXON, S.P. KELL, R.L. BARRETT, P.J. CRIBB (Eds.), *Orchid Conservation*, Natural History Publications, Kota Kinabalu, p. 227–258.
- ŞENEL, G., AKBULUT, M.K., ŞEKER, Ş.S. (2019) Comparative anatomical properties of some Epidendroideae and Orchidoideae species distributed in NE Turkey. *Protoplasma*, 256(3): 655-668.
- SETIAJI, A., ANNISA, R.R., SANTOSO, A.D., KINASIH, A., RIYADI, A.D. (2021) Factors affecting mass propagation of *Vanda* orchid *in vitro*. *Cell Biology and Development*, 5(2).
- SHERIF, N.A., BENJAMIN, J.H.F., KUMAR, T.S., RAO, M.V. (2018) Somatic embryogenesis, acclimatization, and genetic homogeneity assessment of regenerated plantlets of *Anoectochilus elatus* Lindl., an endangered terrestrial jewel orchid. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 132: 303-316.
- 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.
- SOLANO, M.C.P., RUIZ, J.S., ARNAO, M.R., CASTRO, O.C., TOVAR, M.E.G., BELLO, J.J.B. (2019) Evaluation of *in vitro* shoot multiplication and ISSR marker based assessment of somaclonal variants at different subcultures of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks). *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 25: 561-567.

- SOONTHORNKALUMP, S., YAMAMOTO, S., NAKKANONG, K., MEESAWAT, U. (2019) The investigation of condition for cryopreservation of snow-white venus's slipper orchid protocorm [*Paphiopedilum niveum* (Rchb. f.) Stein] using v cryo-plate method. *Songklanakarin Journal Plant Science*, 6(4): 10-18.
- STEGANI, V., ALVES, G.A.C., BERTONCELLI, D.J., FARIA, R.T. (2017) Cryopreservation of seeds of Brazilian edelweiss (*Sinningia leucotricha*). *Ornamental Horticulture*, 23(1): 15-21.
- 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.
- SUTTLEWORTH, F.C., ZIM, H.S., DILLON, G.W. (1982) Orquídeas: Guia dos orquidófilos. Editora Expressão e Cultura, 158 p.
- SWARTS, N.D., DIXON, K.W. (2009) Perspectives on orchid conservation in botanic gardens. *Trends in Plant Science*, 14:11.
- SWARTS, N.D., DIXON, K.W. (2009) Terrestrial orchid conservation in the age of extinction. *Annals of Botany*, 104: 543-556
- TAMER, C.E, KARAMAN, B., UTKU COPUR, O. (2006) A traditional Turkish beverage: salep. *Food Reviews International*, 22(1): 43-50.
- TARATIMA, W., ROHMAH, K.N., PLAIKHUNTOD, K., MANEERATTANARUNGROJ, P., TRUNJARUEN, A. (2023) Optimal protocol for *in vitro* polyploid induction of *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw. *BMC Plant Biology*, 23(1): 295.
- THAMMASIRI, K. (2021) Conservation of some endangered Thai orchid species using cryopreservation. *II International Symposium on Tropical and Subtropical Ornamentals*, 1334: 163-170.

- TIKENDRA, L., POTSHANGBAM, A.M., DEY, A., DEVI, T.R., SAHOO, M.R., NONGDAM, P. (2021) RAPD, ISSR, and SCoT markers based genetic stability assessment of micropropagated *Dendrobium fimbriatum* Lindl. var. *oculatum* Hk. f.-an important endangered orchid. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 27: 341-357.
- TIKENDRA, L., POTSHANGBAM, A.M., DEY, A., DEVI, T.R., SAHOO, M.R., NONGDAM, P. (2021) RAPD, ISSR, and SCoT markers based genetic stability assessment of micropropagated *Dendrobium fimbriatum* Lindl. var. *oculatum* Hk. f.-an important endangered orchid. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 27, 341-357.
- TSUKAZAKI, H., MII, M., TOKUHARA, K., ISHIKAWA, K. (2000) Cryopreservation of *Doritaenopsis* suspension culture by vitrification. *Plant Cell Reports*, 19: 1160-1164.
- VELDMAN, S., OTIENO, J., VAN ANDEL, T., GRAVENDEEL, B., BOER, H.J. (2014) Efforts urged to tackle thriving illegal orchid trade in Tanzania and Zambia for chikanda production. *Traffic Bulletin*, 26(2): 47-50.
- VENDRAME, W.A., CARVALHO, V.S., DIAS, J.M., MAGUIRE, I. (2008) Pollination of *Dendrobium* hybrids using cryopreserved pollen. *HortScience*, 43(1): 264-267.
- 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. (2011) Phloroglucinol enhances recovery and survival of cryopreserved *Dendrobium nobile* protocorms. *Scientia Horticulturae*, 128: 131-135.
- VETTORAZZI, R.G. (2020) Criopreservação de orquídeas brasileiras do gênero *Cattleya*. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Campos dos Goytacazes/RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 133p.

- VETTORAZZI, R.G., CARVALHO, V.S., TEIXEIRA, M.C., CAMPOSTRINI, E., CUNHA, M., MATOS, E. M., VICCINI, L.F. (2019) Cryopreservation of immature and mature seeds of Brazilian orchids of the genus *Cattleya*. *Scientia Horticulturae*, 256: 108603.
- 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, 167.
- WANG, J.H., GE, J.G., LIU, F., BIAN, H.W., HUANG, C.N. (1998) Cryopreservation of seeds and protocorms of *Dendrobium candidum*. *CryoLetters*, 19: 123-8.
- WORRACHOTTIYANON, W., BUNNAG, S. (2018) Cryopreservation of *Cymbidium finlaysonianum* Lindl. by encapsulation-dehydration method. *Songklanakarinn Journal of Science & Technology*, 40(3): 682-691.
- WRAITH, J., PICKERING, C. (2019) A continental scale analysis of threats to orchids. *Biological Conservation*, 234: 7-17.
- 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.
- YONG, C., JUNHUI, W., CHUNNONG, H. (2001) Germplasm cryopreservation of *Dendrobium candidum* by vitrification. *Journal of Zhejiang University (Agriculture and Life Sciences)*, 27(4): 436-438.
- ZHANG, Y.Y., WU, K.L., ZHANG, J.X., DENG, R.F., DUAN, J., TEIXEIRA DA SILVA, J.A., ZENG, S.J. (2015) Embryo development in association with asymbiotic seed germination *in vitro* of *Paphiopedilum armeniacum* SC Chen et FY Liu. *Scientific reports*, 5(1): 16356.

APÉNDICE

Apêndice A. Resumo da análise de variância com quadrados médios para os efeitos da aplicação do método de criopreservação de sementes das orquídeas *C. guttata* e *E. denticulatum*, por meio da desidratação em sílica-gel e o seu crescimento *in vitro*. Viabilidade (VIA), germinação (GER), número de folhas (NF), volume radicular (VR), área foliar (AF), massa da matéria seca da parte aérea (MMSPA), massa da matéria seca da raiz (MMSR), massa da matéria seca total (MMST), relação Fv/Fm (FV/FM), índice fotossintético (PI) e índice de verde (IV)

FV	QM (<i>C. guttata</i>)						
	GL	VIA	GER	NF	VR	AF	MMSPA
Trat	11	469,917*	1455,972*	0,544*	0,017*	0,336*	0,000039*
Resíduo		3,692	0,158	0,096	0,006	0,037	0,000005
CV (%)		2,39	0,55	7,33	25,63	16,91	11,60
FV	GL	MMSR	MMST	FV/FM	PI	IV	
Trat	11	0,00009*	0,00022*	0,0007 ^{ns}	0,765 ^{ns}	14,193 ^{ns}	
Resíduo		0,00002	0,00003	0,0006	1,100	9,007	
CV (%)		18,87	12,86	3,22	31,99	5,62	
FV	QM (<i>E. denticulatum</i>)						
	GL	VIA	GER				
Trat	11	2361,838*	686,576*				
Resíduo		2,476	0,850				
CV (%)		5,13	8,63				
FV	QM (<i>E. denticulatum</i>)						
	GL	NF	VR	AF	MMSPA	MMSR	
Trat	3	1,0091*	0,0002 ^{ns}	1,1886 ^{ns}	0,00002 ^{ns}	0,000006 ^{ns}	
Resíduo		0,2375	0,0023	0,3400	0,00001	0,000006	
CV (%)		8,38	24,59	12,93	22,92	24,36	
FV	GL	MMST	FV/FM	PI	IV		
Trat	3	0,00005 ^{ns}	0,0080*	0,0438*	7,3091 ^{ns}		
Resíduo		0,00003	0,0017	0,0048	15,1031		
CV (%)		22,20	7,08	27,30	15,84		

*Significativo pelo teste F a 5% de probabilidade.

^{ns}Não significativo pelo teste F a 5% de probabilidade.

Apêndice B. Resumo da análise de variância com quadrados médios para os efeitos da aplicação do método de criopreservação de sementes das orquídeas *C. guttata* e *E. denticulatum*, por meio da desidratação em sílica-gel e o seu crescimento após a aclimatização. Número de folhas (NF), volume radicular (VR), área foliar (AF), massa da matéria seca da parte aérea (MMSPA), massa da matéria seca da raiz (MMSR), massa da matéria seca total (MMST), relação Fv/Fm (FV/FM), índice fotossintético (PI) e índice de verde (IV).

FV	QM (<i>C. guttata</i>)					
	GL	NF	VR	AF	MMSPA	MMSR
Trat	11	4,432 ^{ns}	1,534 ^{ns}	92,189*	0,0192*	0,002 ^{ns}
Bloco	2	0,634	3,614	16,613	0,001	0,004
Resíduo		3,867	0,748	32,222	0,005	0,001
CV (%)		22,71	19,33	19,88	20,93	24,26
		MMST	SPAD	FV/FM	PI	
Trat	11	0,034*	8,189 ^{ns}	0,00016*	4,015 ^{ns}	
Bloco		0,012	64,494	0,00008	3,926	
Resíduo		0,011	11,618	0,00004	2,459	
CV (%)		21,20	6,99	0,83	21,23	

FV	QM (<i>E. denticulatum</i>)					
	GL	NF	VR	AF	MMSPA	MMSR
Trat	11	4,243*	0,597*	114,396*	0,010*	0,005*
Bloco	2	0,173	0,183	55,229	0,005	0,0003
Resíduo		0,426	0,052	7,190	0,0002	0,0004
CV (%)		8,18	17,10	12,20	9,20	18,62
		MMST	SPAD	FV/FM	PI	
Trat	11	0,031*	13,060 ^{ns}	0,0002 ^{ns}	1,604 ^{ns}	
Bloco		0,007	19,191	0,0004	0,187	
Resíduo		0,0005	3,593	0,0004	0,866	
CV (%)		8,36	7,40	2,80	28,97	

*Significativo pelo teste F a 5% de probabilidade.

^{ns}Não significativo pelo teste F a 5% de probabilidade.