



Protocolo para Conservação de Longo Prazo para Sementes de Orquídeas: uma Revisão de Literatura e Proposta Metodológica

Protocol for Long-Term Conservation of Orchid Seeds: a Literature Review and Methodological Proposal

Protocolo para la Conservación a Largo Plazo de Semillas de Orquídeas: una Revisión de la Literatura y una Propuesta Metodológica

Oscar José Smiderle¹

Jane Maria Franco Oliveira²

Aline das Graças Souza³

Resumo

A conservação de sementes de orquídeas representa um desafio fundamental para a manutenção da diversidade genética e ampliar a preservação *ex situ* dessas espécies, devido à sua sensibilidade à umidade, baixa reserva energética e rápida deterioração fisiológica, dada sua relevância ecológica e econômica. Este artigo apresenta revisão de literatura científica sobre técnicas metodológicas de conservação em longo prazo das sementes de orquídeas, com foco em métodos de secagem controlada, e armazenamento em baixas temperaturas pelo congelamento e criopreservação. Identificou-se variações de temperaturas de armazenamento em refrigerador (5°C), congelamento convencional (-18°C) e criopreservação em nitrogênio líquido (-196°C). Estudos indicaram a criopreservação (-196°C) associada à prévia secagem controlada como técnica eficaz para manter a viabilidade das sementes por períodos prolongados, enquanto a secagem combinada com armazenamento refrigerado garante boas taxas de germinação em curto e médio prazo. A partir da síntese dos conhecimentos existentes e de experiências da literatura, propõe-se um protocolo metodológico para a conservação das sementes, aplicável a várias espécies, que assegura elevada taxa de germinação após

¹ Doutor em Fitotecnia. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Boa Vista, Roraima, Brasil.
E-mail: oscar.smiderle@embrapa.br Orcid: <http://orcid.org/0000-0001-6692-1329>

² Doutor em Botânica. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Boa Vista, Roraima, Brasil.
E-mail: jane.franco@embrapa.br Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-4036-2212>

³ Doutor em Produção Vegetal. Universidade Federal da Paraíba, Campus II. Areia, Paraíba, Brasil.
E-mail: alinedasgracas@yahoo.com.br Orcid: <http://orcid.org/0000-0001-8158-5933>





armazenamento prolongado, buscando segurança do acervo e duplicata da coleção. Além disso, estratégias como duplicação de coleções e segurança do acervo são fundamentais para a conservação de espécies ameaçadas de extinção. A revisão destaca ainda avanços científicos e recomendações para bancos de germoplasma, contribuindo para a preservação da biodiversidade e a produção comercial sustentável de orquídeas.

Palavras-chave: Armazenamento. Criopreservação. Germinação. Conservação Genética.

Abstract

Orchid seed conservation represents a fundamental challenge for maintaining genetic diversity and expanding the ex situ preservation of these species, due to their sensitivity to moisture, low energy reserves, and rapid physical deterioration, given their ecological and economic importance. This article presents a review of the scientific literature on methodological techniques for the conservation of orchid seeds over a wide range of environments, focusing on controlled drying and low-temperature storage methods for freezing and cryopreservation. Variations in storage temperatures are identified in refrigerators (5°C), conventional freezing (-18°C), and cryopreservation in liquid nitrogen (-196°C). Studies indicate that cryopreservation (-196°C) combined with controlled pre-drying is an effective technique for maintaining seed viability for long periods, while drying combined with refrigerated storage ensures low germination rates in short and medium-term storage. Based on the synthesis of knowledge and experience existing in the literature, we propose a methodological protocol for seed conservation, applicable to several species, which guarantees high germination rates after prolonged storage, seeking the safety of collection and its duplication. Furthermore, collection duplication and collection security strategies are essential for the conservation of endangered species. The review also highlights scientific advances and recommendations for germplasm banks, contributing to biodiversity preservation and sustainable commercial orchid production.

Keywords: Storage. Cryopreservation. Germination. Genetic Conservation.

Resumen

La conservación de semillas de orquídeas representa un desafío fundamental para mantener la diversidad genética y expandir la preservación ex situ de estas especies, debido a su sensibilidad a la humedad, bajas reservas energéticas y rápido deterioro fisiológico, dada su importancia ecológica y económica. Este artículo presenta una revisión de la literatura





científica sobre técnicas metodológicas para la preservación a largo plazo de semillas de orquídeas, con énfasis en métodos de secado controlado y almacenamiento a baja temperatura mediante congelación y criopreservación. Se identificaron variaciones en las temperaturas de almacenamiento: almacenamiento refrigerado (5°C), congelación convencional (-18°C) y criopreservación en nitrógeno líquido (-196°C). Diversos estudios han indicado que la criopreservación (-196°C) combinada con un secado controlado previo es una técnica eficaz para mantener la viabilidad de las semillas durante períodos prolongados, mientras que el secado combinado con almacenamiento refrigerado garantiza buenas tasas de germinación a corto y mediano plazo. Con base en la síntesis del conocimiento y la experiencia existentes en la literatura, se propone un protocolo metodológico para la conservación de semillas, aplicable a diversas especies, que garantiza una alta tasa de germinación después de un almacenamiento prolongado, buscando la seguridad de la colección y la duplicación de la misma. Además, estrategias como la duplicación y la seguridad de las colecciones son esenciales para la conservación de especies en peligro de extinción. La revisión destaca los avances científicos y las recomendaciones para los bancos de germoplasma, contribuyendo así a la preservación de la biodiversidad y a la producción comercial sostenible de orquídeas.

Palabras clave: Almacenamiento. Criopreservación. Germinación. Conservación Genética.

Introdução

As orquídeas representam uma das famílias de plantas mais diversas e ecologicamente especializadas do mundo, com mais de 27.000 espécies descritas (Magrini & Vitis, 2019; The Plant List, 2020; WFO Plant List, 2024). Pertencente à maior e mais evoluída família de angiospermas, chamada Orchidaceae. Estima-se que cerca de 28.000 espécies de orquídeas com 763 gêneros da família Orchidaceae ocorram em todo o mundo (Gupta, 2016; Christenhusz, 2016).

Sendo uma das maiores famílias de plantas com flores, a Orchidaceae é bem conhecida por sua alta diversidade e ciclos de vida complexos (Pujasatria *et al.*, 2020). Sua ampla distribuição geográfica, que abrange desde florestas tropicais até regiões temperadas, e sua dependência de interações específicas com polinizadores e fungos micorrízicos tornam-na particularmente vulneráveis a ameaças como destruição de habitats, coleta ilegal e mudanças climáticas (Swarts & Dixon, 2017). Estima-se que 1.300 espécies de orquídeas estejam na





Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da União Internacional para a Conservação da Natureza, incluindo aquelas classificadas como criticamente em perigo (IUCNN, 2023).

Nesse contexto, a conservação *ex situ*, por meio do armazenamento de sementes, emerge como uma estratégia crucial para a preservação da diversidade genética e ecológica dessa família. O uso de orquídeas como planta economicamente importante reduz sua população nativa, o que destaca a necessidade de conservação (Pujasatria *et al.*, 2020).

A peculiaridade das sementes de orquídeas, caracterizadas por seu tamanho diminuto, ausência de endosperma e dependência de micorrizas para germinação natural, impõe desafios adicionais à sua conservação. Apesar dessas dificuldades, estudos têm demonstrado que muitas espécies apresentam comportamento ortodoxo, permitindo-lhes tolerar secagem e armazenamento em baixas temperaturas (congelamento) sem perda significativa de viabilidade (Pritchard & Seaton, 1993).

Entretanto, a variabilidade nas características fisiológicas e bioquímicas entre as espécies de orquídeas, como teor de lipídios e composição da parede celular, influenciam diretamente a longevidade das sementes no armazenamento. Por exemplo, sementes de espécies do gênero *Cattleya* apresentam elevada concentração de lipídios (54–70% do peso seco) e são sensíveis a temperaturas de armazenamento convencionais, como -20°C, apresentando redução na germinação após períodos prolongados.

Além disso, a escolha do meio de germinação adequado é fundamental para avaliar corretamente a viabilidade das sementes após o armazenamento. Estudos indicam que meios como Knudson C e BM-1 são eficazes para germinação assimbiótica de sementes de orquídeas, enquanto outros, como MS e WPM, podem ser menos eficientes dependendo da espécie.

Entretanto, as sementes de orquídeas apresentam particularidades fisiológicas, como a ausência de endosperma e alta relação superfície-volume, que demandam cuidados específicos durante a conservação. Diante desse cenário, torna-se evidente a necessidade de estabelecer protocolos padronizados para a conservação de sementes de orquídeas, que considerem as particularidades de cada espécie e garantam a manutenção da viabilidade das sementes por períodos prolongados.

A presente revisão, visa descrever metodologias eficazes existentes para a conservação de sementes de orquídeas, com foco em secagem, temperaturas de armazenamento, avaliação da viabilidade e germinação, meios de germinação, propondo um protocolo metodológico que





possa ser aplicado a diversas espécies, assegurando alta taxa de germinação e segurança no armazenamento.

Referencial Teórico

As orquídeas constituem uma das maiores famílias de plantas angiospermas, com mais de 25.000 espécies descritas globalmente para Chase *et al.* (2015), mas Christenhusz *et al.* (2016) indicavam 28.000 espécies, para Magrini & De Vitis (2019) mais de 27.000 em todo o mundo conforme a The Plant List (2020) e mais de 31.000 espécies segundo WFO Plant List (2024). Seu valor ecológico, estético e econômico é significativo, especialmente em contextos de conservação da biodiversidade e na indústria florícola. Com o aumento da demanda por usos medicinais e hortícolas, a Orchidaceae precisa de técnicas de reprodução inovadoras adequadas ao mercado e à conservação (Shao *et al.*, 2017). Contudo, diversas espécies estão ameaçadas devido à perda de habitat, coleta predatória e mudanças climáticas (Fay, 2018).

Orchidaceae é a segunda maior família entre as plantas com flores e uma de suas características mais fascinantes é a morfologia da semente (Zoubi, 2024). A conservação ex situ, por meio de bancos de sementes, é uma estratégia eficaz para preservar a diversidade genética de orquídeas. Entretanto, as características biológicas das sementes, como pequeno tamanho e alta sensibilidade a condições ambientais, impõem desafios para a conservação a longo prazo (Seaton & Pritchard, 2013). Métodos padronizados de secagem e armazenamento, que garantam a viabilidade das sementes após prolongados períodos, são essenciais para o sucesso dos bancos genéticos. Com o intuito de conservá-las em bancos de sementes, várias instituições vêm empregando técnicas para análise da qualidade fisiológica destas sementes, com a finalidade de armazená-las e garantir a sobrevivência das espécies mais ameaçadas.

Essa diversidade está associada à grande variação morfológica, adaptações reprodutivas específicas e interações ecológicas complexas, como a dependência de polinizadores especializados e de fungos micorrízicos para a germinação natural.

No entanto, a propagação das orquídeas enfrenta barreiras significativas, especialmente quanto à conservação das sementes, que são caracterizadas por baixa reserva energética, alta sensibilidade à umidade e rápida deterioração fisiológica (Pritchard & Nadarajan, 2008). Essas características tornam essencial o desenvolvimento de técnicas de armazenamento que prolonguem a viabilidade das sementes, permitindo a segurança do





acervo e a duplicata de coleções em bancos de germoplasma (Soares *et al.*, 2014; Franceschi *et al.*, 2019).

A conservação *ex situ*, particularmente via armazenamento de sementes, é uma estratégia essencial para manter o patrimônio genético dessas plantas e possibilitar programas de reintrodução e cultivo.

Diferentes métodos têm sido propostos para a conservação de sementes de orquídeas, incluindo refrigeração, congelamento convencional e criopreservação (SciELO Brasil, 2006). A criopreservação em nitrogênio líquido (-196°C) tem mostrado grande eficiência na conservação a longo prazo, reduzindo os danos oxidativos e preservando a viabilidade das sementes (Hengling, 2015). No entanto, alternativas como secagem controlada associada ao armazenamento a 5°C também apresentam bons resultados para períodos intermediários (Pritchard, 2014).

2.1 Estrutura e Biologia das Sementes de Orquídeas

As sementes de orquídeas apresentam arquitetura celular simples e são aneladas por uma fina camada celular sem reservas endospermicas e bem como compostas por uma massa indiferenciada de células embrionárias cobertas por um tegumento transparente ou visível (Verma *et al.*, 2014). A orquídea produz grande número de sementes, e também apresentam variações no seu formato tais como, fusiforme, espatulado, ovoide e filiforme; a cor das sementes também varia, incluindo amarelo alaranjado, amarelo acastanhado, amarelo, branco, amarelo claro, amarelo dourado e amarelo claro (Utami & Hariyanto, 2020).

É sabido que, as orquídeas são conhecidas por produzirem as menores sementes sendo o formato da semente "semelhante a pó" com tamanhos que variam de 0,05 a 6 milímetros e/ou pesos que variam de 0,31 a 24 microgramas (Roberts & Dixon, 2008) por sua vez as taxas de germinação dessas sementes são baixas, normalmente inferiores a 1% (Verma *et al.*, 2014).

Essa morfologia as torna altamente suscetíveis à desidratação, devido a que a ausência de endosperma obriga a dependência simbiótica com fungos micorrízicos para germinação em habitat natural e influenciam sua classificação quanto ao comportamento no armazenamento (Lee & Yeung, 2023). No entanto, técnicas de germinação assimbiótica *in vitro* permitem a superação dessa limitação, sendo amplamente utilizadas em bancos de germoplasma e laboratórios (Seaton & Pritchard, 2011). O conhecimento dessas





características permite definir estratégias eficientes de conservação e evitar perdas significativas de viabilidade ao longo do tempo (Pritchard & Nadaraja, 2008).

Um dos fatores de complicações importantes é que as sementes são minúsculas e não possuem endosperma, tecido nutritivo responsável pelo desenvolvimento do embrião e pela germinação das sementes (Ray & Vendrame 2015) o que significa que dependem quase inteiramente de fontes externas de nutrientes durante a germinação ou desenvolvimento (Zoubi, 2024). Além disso, outros parâmetros que impactam a germinação de sementes de orquídea incluem associação com fungos micorrízicos, condições de luz, temperatura, umidade, composição do substrato, trocas gasosas, viabilidade e idade da semente, sinais hormonais e mecanismos de dormência (Arditti, 1980; Schwabe, 1981; Zoubi, 2024).

Os problemas e as conquistas na germinação de orquídeas são muito desafiadores e oferecem grandes perspectivas no campo da conservação de orquídeas. Zoubi (2024), destaca alguns avanços que ocorreram recentemente e maneiras que podem ser adotadas para melhorar sua eficácia no futuro. Por exemplo, a eficácia e a capacidade de cultivar orquídeas melhoraram devido aos avanços em cultura de tecidos *in vitro* e biotecnologia.

Técnicas simbióticas e assimbióticas são utilizadas nesses esforços e mais estudos são necessários para aprimorar o manejo e a preservação dessas plantas. A germinação simbiótica requer interação com fungos micorrízicos, que fornecem os nutrientes e o suporte necessários para o crescimento das mudas (Zoubi, 2024). No entanto, em abordagens assimbióticas, condições controladas são fornecidas para promover a germinação utilizando meios ricos em nutrientes.

No entanto, a eficiência e a aplicabilidade dessas estratégias podem variar dependendo da espécie de orquídea e das condições ambientais. No entanto, ressalta Zoubi (2024) que mais pesquisas são necessárias para refinar essas técnicas e melhorar sua aplicabilidade no armazenamento de sementes de orquídeas. Sugere-se que a compreensão completa dessas estratégias e seus mecanismos subjacentes podem levar a esforços de conservação mais eficazes para espécies de orquídeas ameaçadas de extinção. Para Zoubi (2024), embora tenha havido progresso significativo na compreensão e no aprimoramento dos processos de germinação de orquídeas, mais estudos e inovação são necessários. Ao resolver os problemas restantes e investigar novas abordagens, pode ser possível auxiliar melhor a conservação de orquídeas e incentivar o cultivo a longo prazo dessas plantas.





2.2 Técnicas de Secagem

A secagem adequada é fundamental para reduzir o teor de água das sementes, minimizando a atividade metabólica e a deterioração. O uso de dessecantes como sílica gel e cloreto de cálcio ou sulfato de cálcio em ambientes controlados tem sido estudados (Hay & Probert, 2013; Quijia-Lamiña *et al.*, 2023). Os teores de água das sementes de espécies de orquídeas variam entre 3 e 5%, em ambiente com umidade relativa (UR) de 15–20% (Seaton *et al.*, 2018). Por sua vez, o teor de água ideal para sementes de orquídeas varia entre 3% e 7%, valor crítico para manter a viabilidade durante o armazenamento em baixas temperaturas (FAO, 2014).

Entretanto as sementes de orquídeas podem ser secas em soluções saturadas de cloreto de cálcio ou cloreto de lítio (Pritchard *et al.*, 1999). Onde não há disponibilidade de cloreto de cálcio ou de cloreto de lítio, o uso de arroz seco em estufa é um método fácil e prático para a secagem de sementes de orquídea, para cultivadores iniciais, e pode fornecer UR equivalente à do cloreto de cálcio (Seaton *et al.*, 2018). Uma solução saturada de cloreto de cálcio produz UR de 30% a 20 °C, e a solução saturada de cloreto de lítio produz UR de 12,4% a 20 °C (Hay *et al.*, 2008; Seaton *et al.*, 2018). Umidades relativas mais altas podem ser alcançadas usando concentrações específicas da solução (Hay *et al.*, 2008).

2.3 Temperatura e Umidade

Sementes de orquídeas podem germinar em temperaturas entre 6 e 40°C (Arditti, 1967), sendo a temperatura mais adequada de 25°C ± 2°C (Hossain *et al.*, 2010; Zeng *et al.*, 2011; Mohanty & Salem, 2017). A umidade também é um fator importante a ser considerado durante a germinação das sementes e o desenvolvimento de protocormos e mudas. Geralmente, 70 a 80% de umidade relativa do ar é considerada a melhor para as orquídeas (Arditt, 1967; Paul *et al.*, 2012).

Sementes de orquídeas padronizadas em relação aos graus de umidade (4, 6, 8, 10, 12 e 15%) e submetidas ao congelamento rápido em nitrogênio líquido (-196 °C) durante 24 horas; descongeladas e analisadas revelaram maior percentual de viabilidade, tanto para as sementes de *Cattleya labiata* Lindl. quanto para *Miltonia regnelli* Rchb.f., imersas em nitrogênio líquido com 4% de umidade, atingindo 95 e 68% de sementes viáveis,





respectivamente, sendo que, as sementes com 12 e 15% de umidade não apresentaram sementes viáveis (Ferrari *et al.*, 2020).

2.4 Armazenamento de Sementes em Baixa Temperatura

O armazenamento a temperaturas entre -18°C e -20°C é o método mais difundido para conservação de sementes ortodoxas, retardando processos de envelhecimento e mantendo a viabilidade por décadas (International, 1992). Estudos específicos com sementes de orquídeas demonstraram manutenção da viabilidade superior a 50% após 10 anos em câmaras frias (Seaton & Pritchard, 2013). Armazenamento a -20°C (freezers comuns) e a -80°C (ultrafreezers) tem mostrado resultados positivos em diferentes espécies, como *Gomesa forbesii* e *Cattleya walkeriana*, que mantiveram alta viabilidade após 12 meses (Santos *et al.*, 2016). Temperaturas criogênicas (-196°C) são estudadas para conservação a longo prazo, embora apresentem desafios logísticos.

A criopreservação em nitrogênio líquido é alternativa para espécies sensíveis, mas requer infraestrutura avançada (Pritchard *et al.*, 2020). O armazenamento de sementes de orquídeas em baixa temperatura por um período específico, seguido da germinação *in vitro* e posterior desenvolvimento em plantas, também é um método importante de propagação e conservação de germoplasma e tem sido aplicado em orquídeas para obter melhores resultados.

No entanto, a viabilidade de sementes armazenadas em baixa temperatura varia de espécie para espécie. Por exemplo, em *Hadrolaelia grandis*, sementes foram armazenadas a -20°C e -80°C por 36 meses. As armazenadas a -80°C permaneceram viáveis (80%) por 36 meses e apresentaram germinação máxima em meio para plantas lenhosas (WPM) (Vudala & Ribas, 2017). Entretanto, em *Brasiliorchis picta*, sementes armazenadas a -20°C e -80°C por 1, 3, 6 e 12 meses, verificaram nas sementes armazenadas a -20°C por 12 meses 76% de germinação no meio WPM (Santos *et al.*, 2016).

Hengling *et al.* (2020) avaliaram efeitos da temperatura de armazenamento na qualidade fisiológica de sementes de sete espécies de orquídeas (*Cattleya crispata*, *C. rupestris*, *C. schilleriana*, *C. tenebrosa*, *C. loddigesii*, *C. intermedia* and *C. warneri*) obtidas de diversos biomas. As sementes divididas em subamostras, pré-condicionadas a 0,03g, H₂O, DW1 por uma semana em solução supersaturada de cloreto de lítio a 23 ± 2 °C e mantidas em recipientes com vedação de borracha por nove meses sob quatro temperaturas de





armazenamento: temperatura ambiente (23 ± 2 °C), 5°C, -18°C e -196°C em meio Murashige-Skoog (MS) (Murashige & Skoog, 1962).

Hengling *et al.* (2020) verificaram para *Cattleya crispata*, em sementes armazenadas em temperaturas -18 e -196°C viabilidade por nove meses com germinação >80% aos 90 dias em meio MS. No entanto, em *C. rupestris*, os melhores valores obtidos de germinação nas sementes armazenadas por 270 dias a -18°C foi de 90%. Vale destacar que as sementes, desta espécie, conservaram até 180 dias com germinação superior a 80% nos quatro tratamentos (Hengling *et al.*, 2020).

Para a *C. schilleriana*, nas temperaturas de -18 e -196°C aos 180 dias as sementes germinaram mais de 70%. Em *C. tenebrosa*, aos 90 dias as sementes germinaram mais de 90% quando armazenadas a -196°C e nos demais tratamentos a germinação foi próxima dos 60% apenas. Para *C. loddigesii*, a -196°C aos 180 dias obtiveram mais de 90% de germinação enquanto a 5 e -18°C próximo de 70% aos 90 dias. Sementes de *C. intermedia*, germinaram próximo dos 90% aos 180 dias em temperatura de -196°C e a -18°C 90% aos 90 dias de armazenamento.

Em *C. warneri*, resultou em germinação superior a 90% aos 180 dias quando armazenadas a -196°C, 5°C e 23°C, enquanto a -18°C apenas 60% de germinação aos 180 dias foi registrada. Vale destacar que as sete espécies foram mantidas e avaliadas em meio MS por Hengling *et al.* (2020).

Em estudos, Teixeira (2019) avaliou a germinação e viabilidade de sementes de cinco espécies de orquídeas tropicais nativas (*Catasetum fimbriatum*, *Cattleya lundii*, *Galeandra beyrichii*, *Macradenia paraensis* e *Zygopetalum maxillare*) do Parque Estadual do Morro do Diabo - Teodoro Sampaio-SP.

As sementes acondicionadas com teor de água de 6,4% e nas temperaturas 20 °C e -18 °C por seis meses de armazenamento. A qualidade fisiológica das sementes foi avaliada antes e após armazenamento, pelos testes de tetrazólio, de germinação e índice de velocidade de germinação, que indicam vigor e viabilidade. As culturas *in vitro* permaneceram em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas à temperatura de 25 ± 2 °C por, no máximo, 8 semanas.

Contudo, para *Galeandra beyrichii* (espécie terrestre) foram utilizadas duas condições de luminosidade, germinação em luz e no escuro. O armazenamento a 20 °C por três e seis meses, não favoreceram *C. fimbriatum*, *G. beyrichii* e *Z. maxillare*, uma vez que, a primeira não germinou no final de seis meses e as duas últimas não germinaram em nenhum período.





Na temperatura de 20 °C a *Z. maxillare* apresentou perda de viabilidade a partir do terceiro mês de armazenamento e *M. paraensis*, a partir do sexto mês. Entretanto a -18 °C, a maioria das espécies estudadas germinaram melhor no decorrer de seis meses. De acordo com os resultados do teste de tetrazólio, a espécie de *Catasetum* e *Cattleya* mantiveram alta taxa de viabilidade de sementes nas temperaturas e tempos avaliados, diferentemente de *G. beyrichii* que, nos seis meses de armazenamento, apresentou acentuada perda de viabilidade.

De acordo com autor supracitado, afirma que sementes de *Catasetum fimbriatum* mantem viabilidade alta até seis meses, contudo, não ocorreu germinação ao sexto mês de armazenamento em temperatura de 20°C. Conclui ainda Teixeira (2019), que sementes de *Cattleya lundii* mantém a viabilidade alta durante seis meses nas duas condições de temperaturas (20 °C e -18 °C) e esta espécie apresentou maior porcentagem de germinação aos seis meses de armazenamento em temperatura de 20°C.

Já para *Galeandra beyrichii* apresenta sementes sensíveis à luz, germinando melhor em ambiente escuro enfatiza Teixeira (2019) e complementa que o armazenamento em -18°C manteve a viabilidade das sementes de *Macradenia paraensis*. E, esta espécie obteve baixa germinação ao fim de seis meses de armazenamento em 20°C (Teixeira, 2019).

As sementes de *Zygopetalum maxillare* apresentaram dormência no início do armazenamento a -18°C e perda de viabilidade em 20°C conclui Teixeira (2019). O melhor ambiente de armazenamento para a conservação de sementes das espécies (*Catasetum fimbriatum*, *Cattleya lundii*, *Galeandra beyrichii*, *Macradenia paraensis* e *Zygopetalum maxillare*), é a temperatura de -18°C para sementes com 6,4% de teor de água (Teixeira, 2019).

Os dados obtidos supõem a classificação de sementes ortodoxas de vida curta para as espécies de orquídeas (*Catasetum fimbriatum*, *Cattleya lundii*, *Galeandra beyrichii*, *Macradenia paraensis* e *Zygopetalum maxillare*). Teixeira, (2019) faz considerações em seu estudo, indicando que para se obter bons comparativos, sugere complementar o trabalho com teores de água nas sementes acima e abaixo de 6,4%; outras temperaturas de acondicionamento, 5°C (geladeira) 25 °C (sala com temperatura estável) ou -196 °C (nitrogênio líquido), bem como distintos meios de culturas, tais como, MS (Murashige & Skoog), com adição de polpa de banana, Knudson C (KC) e Vacin & Went (VW).

Vale ressaltar que a coleta de sementes é de suma importância nesta etapa, especial para a conservação eficiente. Cápsulas maduras de *Epidendrum geminiflorum* Kunth, por exemplo, coletadas de uma pequena população de orquídeas nativas colocadas em sacos de papel estéril e, posteriormente são transportadas para laboratório de pesquisa.





É sabido que cada cápsula de orquídea apresenta milhares de sementes; no entanto, apenas 2 a 3% germinam em condições naturais (Valencia-Glushchenko *et al.*, 2024). As sementes removidas das cápsulas e armazenadas em frascos de vidro com tampas frouxas, sobre dessecante de CaSO_4 , dentro de tubos Falcon® de 50 mL selados no escuro a $22 \pm 2^\circ\text{C}$ é um método promissor e viável.

Adicionalmente a isso, as sementes devem ser submetidas a secagem por 10 semanas após a coleta, antes de serem armazenadas a -10°C no escuro até a utilização (Quijia-Lamiña *et al.*, 2023). Um frasco com sementes mantido a $22 \pm 2^\circ\text{C}$ no escuro por sete semanas adicionais permite verificar perda de viabilidade das sementes no tempo nessas condições de armazenamento.

Metodologia

A revisão foi realizada para investigar as condições ideais de armazenamento a longo prazo de sementes de orquídeas, buscando identificar técnicas eficazes (ex: criopreservação, armazenamento a baixa temperatura, armazenamento a seco) e bem como propor um protocolo metodológico viável para conservação das sementes a longo prazo. Assim, foi formulada a seguinte pergunta de pesquisa: Quais são os métodos mais eficazes para conservar a viabilidade de sementes de orquídeas em longo prazo? Utilizou-se critérios para inclusão (artigos científicos, dissertações, protocolos técnicos, revisões sistemáticas, publicados nos últimos 20 anos) e exclusão (estudos sem dados experimentais, duplicados, ou que tratem de outras famílias botânicas). Foi realizada busca Sistemática na Internet em bases como: Scopus, Web of Science, ScienceDirect, SciELO Brasil, Annals of Botany, Google Acadêmico, Teses e Dissertações e capítulos de livro fazendo uso das palavras-chave: Orchid seed storage, cryopreservation orchids, viabilidade de sementes de orquídeas, armazenamento de sementes de orquídeas.

Dentre o universo obtido foram destacados 14 títulos que atenderam aos nossos critérios de elegibilidade e foram utilizados para a construção da revisão e como base para o estabelecimento de uma proposta metodológica para armazenamento de sementes de orquídeas a longo prazo. Para cada estudo considerado verificou-se, dados qualitativos como: autores, espécies, métodos de armazenamento de sementes, origem da semente, teste de viabilidade e condições de germinação; e dados quantitativos como: duração do estudo, temperaturas utilizadas, duração do armazenamento, taxa média de germinação obtida foram





verificados. Além destes aspectos foi anotado o meio de cultivo utilizado nos testes de germinação para determinar a viabilidade das sementes das diferentes espécies de orquídeas testadas.

Proposta Metodológica

4.1 Coleta e Preparação/ Caracterização das Sementes

Sementes de orquídeas, incluindo espécies do gênero *Epidendrum*, devem ser coletadas no ponto ideal de maturação, identificado por mudança de coloração e textura da cápsula, coletadas de plantas matrizes localizadas em ambientes naturais e em cultivos comerciais. As sementes são extraídas diretamente das cápsulas maduras, seguindo os critérios de maturação definidos por Arditti & Ghani (2000), que indicam coloração uniforme da cápsula e leve deiscência como sinais de maturidade fisiológica.

Em seguida devem ser submetidas à limpeza para remoção de resíduos vegetais e microrganismos. Cada amostra coletada é submetida a uma caracterização morfológica inicial, incluindo: Medição do tamanho das sementes por microscopia óptica (média de 100 sementes por lote); Determinação da umidade inicial por método de estufa a 105°C por 24 horas; Avaliação da viabilidade inicial por teste de tetrazólio, seguindo o protocolo de Franceschi *et al.*, (2019).

4.2 Secagem

A secagem é realizada em dessecadores contendo sílica gel a temperatura ambiente (20–25°C), monitorando o teor de água até atingir 5% em peso, com controle diário da umidade relativa e do teor hídrico. Para determinar o impacto da umidade na conservação das sementes, é realizada secagem controlada utilizando dois métodos:

1º- Dessecadores com sílica gel – As sementes são distribuídas em placas de Petri e armazenadas com sílica ativa, até atingirem aproximadamente 10-15% de umidade (Pritchard & Nadarajan, 2008).

2º Dessecagem em fluxo de ar quente – As sementes são mantidas em estufas ventiladas a 30°C, com controle da umidade por pesagem periódica, conforme metodologia de Hengling (2015). O teor de água deve ser monitorado utilizando um higrômetro digital e





comparado com valores recomendados para armazenamento de longo prazo de sementes ortodoxas (ISTA, 2007).

4.3 Determinar Viabilidade das Sementes

Após a retirada das sementes da cápsula, são adicionadas em placas de Petri e secas de acordo com o método Orchid Seed Storage for Sustainable Use (OSSSU), recomendado por Seaton & Ramsay (2005). As sementes são mantidas em dessecador por cinco dias para reduzir o teor de água. Em seguida, sementes secas são colocadas em pequeno frasco hermético e, os frascos menores colocados em um frasco maior com um sachê de sílica laranja como indicador para garantir que o frasco permaneça hermético.

Em seguida, o frasco recebe o nome da espécie e a data de armazenamento em seguida é realizado o armazenamento em freezer a -20°C . O teste de viabilidade realizado após diferentes períodos (Seaton & Ramsay, 2005; Puspitaningtyas & Handini, 2014).

Para determinar a viabilidade das sementes utilizam-se diferentes substratos na semeadura de orquídeas tais como: Knudson C (KC) puro com adição de microelementos, sendo H_3BO_3 0,056 mg/l, MoO_3 0,016 mg/L, ZnSO_4 0,331 mg/L e CuSO_4 0,624 mg/L (Seaton & Ramsay, 2005), KC (modificação de Knudson C com adição de 1g/L de carvão ativado, extrato de broto de feijão 150 g/L e água de coco 150 ml/L), VW (modificação de Vacin e Went com adição de carvão ativado 1 g/L, extrato de broto de feijão 100 g/L, extrato de tomate 100 g/L e água de coco 150 ml/L) e HS (fertilizante foliar Hyponex com adição de carvão ativado 1 g/L, peptona 2 g/L e batatas 40 g/L) (Puspitaningtyas & Handini, 2014).

Mora-Herrera *et al.* (2025), determinaram efeitos do ácido salicílico na aclimação *ex vitro* de microplantas de *Laelia autumnalis*, *Epidendrum* sp. e *Encyclia* sp. obtidas de uma fonte permanente de material biológico, cultivadas em meio Murashige-Skoog (MS). O ácido salicílico aumenta a sobrevivência em condições *ex vitro* e o crescimento diferencial em microplantas de orquídeas.

4.4 Armazenamento

O armazenamento de sementes é uma oportunidade para conservação de orquídeas, permitindo tanto a preservação quanto a fácil distribuição de material com ampla base genética. Kumaria *et al.* (2024) caracterizaram as sementes de orquídeas como fusiformes,





amarelo-esbranquiçadas, com comprimento de 700 a 900 μm e teor de água de 5%. O autor supracitado destaca ainda que as sementes foram semeadas em meio de Murashige & Skoog (1962) suplementado com 30 g/L de sacarose (P.A. SigmaTM), solidificado com 2 g/l de agente gelificante (Phytigel: SigmaTM) e ajustado para pH 5,5 antes da esterilização a 120 °C por 15 minutos.

A germinação iniciou-se sete dias após a semeadura, a formação do protocormo globular aos 30 dias e a formação da plântula ocorreu aos 150 dias. As sementes criopreservadas apresentaram 87,15% de viabilidade, 78,32% de germinação, com 8,48% de sobrevivência.

Já Andriolli *et al.* (2023), colocaram sementes de *C. crispa* para embeber em água destilada estéril com uma gota de detergente surfactante (TweenTM 20) durante 10 minutos, sob agitação constante. Em seguida, foram esterilizadas com hipoclorito de sódio (NaClO) a 0,5% por 10 minutos e enxaguadas três vezes com água destilada estéril. As trocas de solução foram feitas com uma pipeta Pasteur esterilizada. As sementes foram semeadas em meio de Murashige & Skoog (1962) suplementado com 30 g/L de sacarose (P.A. SigmaTM), solidificado com 2 g/L de agente gelificante (Phytigel: SigmaTM) e ajustado para pH 5,5 antes de serem esterilizadas a 120 °C por 15 minutos. As culturas foram mantidas em sala de crescimento a 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 16 h com intensidade luminosa de $50\text{-}60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ por meio de lâmpadas fluorescentes transparentes.

Os autores supracitados revelaram que sementes de *C. crispa* exibiram alta viabilidade e bem como germinação superior. Vale destacar que o valor inicial de teor de água das sementes de *C. crispa* foi de 5%, o que indica sua natureza ortodoxa e permite uma técnica simples de criopreservação. Isso confirma que sementes de orquídeas com teor de água abaixo de 13% podem ser criopreservadas com sucesso por imersão direta em nitrogênio líquido (Popova *et al.*, 2016).

Diversos estudos de criopreservação apresentaram sucesso em diferentes espécies de orquídeas, constatando que as taxas de germinação após o armazenamento em nitrogênio líquido permaneceram iguais ou superiores (Nikishina *et al.*, 2007; Popova *et al.*, 2016).

Andriolli *et al.* (2023) realizaram a criopreservação das sementes por congelamento ultrarrápido com imersão direta em nitrogênio líquido (-196 °C). Após 48 h, os criotubos contendo 20 mg de sementes foram descongelados em banho-maria a 40 °C por 2 min. Em seguida, as sementes foram esterilizadas e cultivadas, enquanto as não criopreservadas foram





esterilizadas e cultivadas imediatamente. Aos seis meses de armazenamento, no primeiro ano, obtiveram germinação acima de 90% no meio de Murashige & Skoog (1962).

Por sua vez, Puspitaningtyas & Handini (2020), armazenaram sementes de *Cymbidium finlaysonianum* Lindl. uma orquídea nativa da Indonésia, com flores pendentes e cores relativamente atraentes, após diferentes períodos, até sete anos, na temperatura de -20°C. Avaliaram quatro meios de cultura (Knudson C - KCA, Knudson C modificado - KC, Vacin & Went modificado - VW e fertilizante Hyponex modificado -HS) na determinação da germinação assimbiótica.

Aos 12 meses de armazenamento, no primeiro ano, obtiveram germinação acima de 92% até três meses nos quatro meios e até aos 12 meses 73,68% e 85,30% nos meios KC e HS. Estes resultados revelaram que a germinação das sementes reduziu após 2 anos de armazenamento, mais acentuado no meio KCA (50,68%) e para apenas 6,67% no terceiro ano de armazenamento. Estas sementes ficaram quase inviáveis aos seis anos de armazenamento.

Em síntese: Sementes são armazenadas em tubos herméticos de polipropileno, mantidos em câmaras frias a -18°C ± 2°C. As condições de umidade são mantidas abaixo de 50% e monitoradas por sensores. Armazenamento: Sementes secas distribuídas em três condições de armazenamento: Refrigeração a 5°C – Mantidas em tubos de vidro hermeticamente fechados e protegidos da luz; Congelamento convencional a -18°C – Armazenadas em tubos criogênicos estéreis, com vedação reforçada para evitar entrada de umidade; Criopreservação em nitrogênio líquido (-196°C) – As sementes transferidas para criotubos especiais e imersas diretamente no nitrogênio líquido, permitindo congelamento ultrarrápido para preservação celular, conforme Pritchard (2014).

Condições de Armazenamento indicadas: Sementes armazenadas por 6 meses, 1 ano e 2 anos em: 1Refrigeração (5°C) – Em frascos hermeticamente fechados e protegidos da luz; 2Congelamento (-18°C) – Uso de tubos criogênicos estéreis para evitar entrada de umidade; 3Criopreservação (-196°C) – Imersão direta em nitrogênio líquido (Pritchard, 2014).

4.5 Segurança e Duplicação

A coleção é duplicada e armazenada em local separado geograficamente, com controle de qualidade e documentação detalhada para garantir rastreabilidade e segurança do acervo.





Referências

- Andriolli, B.V.; Corredor-Prado, J.P.; Pescador, R.; Montoya-Serrano, F.S.; Dal Vesco, L.L.; & Suzuki, R.M. (2023). Morfoanatomia da germinação e criopreservação in vitro da orquídea *Cattleya crispera* (Orchidaceae). **Revista de Biologia Tropical**, v.71, n. 1, p.e52338.
- Arditti, J. (1967). Factors affecting the germination of orchid seeds. **The Botanical Review**, v.33, n.1, p.1–97.
- Arditti, J. (1980). **Aspects of the Physiology of Orchids**. In Advances in botanical research. (p. 421–655).
- Arditti, J.; & Ghani, A.K.A. (2000). **Orchid propagation: biology and technology**. New York, NY, USA, p. 283–302.
- Chase, M.W.; Cameron, K.M.; Freudenstein, J.V.; Pridgeon, A.M.; Salazar, G.; Berg, C.V.D.; & Schuiteman, A. (2015). An updated classification of Orchidaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*, v.177, n.2, p. 151-174.
- Christenhusz, M.J.M.; & Byng, J.W. (2016). The number of known plants species in the world and its annual increase. **Phytotaxa**, v.261, n.3, p. 201–217.
- FAO. (2014). *Genebank Standards for Plant Genetic Resources for Food and Agriculture*.
- Fay, M. (2018). Orchid conservation: how can we meet the challenges in the twenty-first century? *Botanic Studies*, v. 59, p.16.
- Ferrari, E.A.; Colombo, R.C.; Faria, R.T.; Neves, C.S.; & Vero, F.D. (2020). Degree of moisture in seeds for the cryopreservation of orchids native to Brazil, **Ciência Rural**, v.12, n.50, p.345-352.
- Franceschi, C.R.B.; Smidt, E. C.; Vieira, L.N.; & Ribas, L.L.F.(2019). Storage and in vitro germination of orchids (Orchidaceae) seeds from Atlantic Forest – Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.91, n.3, p. e20180439.
- Gupta, A. (2016). Asymbiotic seed germination in orchids: role of organic additives. **International Advanced Research Journal in Science, Engineering and Technology**, v.3, n.5, p.143–147.
- Hay, F.R.; & Probert, R.J. (2013). Seed storage and conservation of Australian terrestrial orchids. *Seed Science Research*, v.23, n.3, p.181-192.
- Hay, F.R.; & Probert, R.J. Seed storage and conservation of Australian terrestrial orchids. *Seed Science Research*, v.23, n. 3, p.181-192, 2013.
- Hay, F.R.; Adams, J.; Manger, K.; & Probert, R. (2008). The use of nonsaturated lithium chloride solutions for experimental control of seed water content. **Seed Science Technology**, v. 36, p.737–746.





- Hengling, M.M.; Gianeti, T.M.R.; Hosomi, S.T.; Nelson, B.; Machado-Neto, N.B.; & Custódio, C.C. (2020): Storage of Brazilian *Cattleya* seeds from diverse biomes: lipid composition and effects on germination, **Plant Biosystems**, v.2, p.1-12.
- Hossain, M.M.; Sharma M.; Teixeira da Silva J.A.; & Pathak P. (2010) Seed germination and tissue culture of *Cymbidium giganteum* Wall. ex Lindl. **Scientia Horticulturae**, v.123, n.4, p.479-487.
- Teixeira, W F. (2019). **Conservação de sementes de orquídeas tropicais nativas do Oeste Paulista**. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, p.68.
- International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI). (1992). *Genebank Standards*. Rome: IPGRI.
- ISTA (International Seed Testing Association). 2020. Seed viability and storage guidelines.
- IUCNN. (2023). **The IUCN red list of threatened species**. IUCN Web. <https://www.iucnredlist.org/search?query=orchids&searchType=species>.
- Kumaria, S.; Dohling, S.; & Singh, N. (2025). *Cryoconservation efforts for endangered orchids: preserving Dendrobium longicornu lindl. and Dendrobium formosum roxb. ex lindl.* **Journal of Emerging Technologies and Innovative Research**, v.11, n.4, p. 470–475.
- Lee, Y.I.; & Yeung, E.C. (2023). The orchid seed coat: a developmental and functional perspective. **Botanical Studies**, v.64, n.1, p.233-239.
- Magrini, S. J.; & De Vitis, M. (2019). Seed banking of terrestrial orchids: evaluation of seed quality in *Anacamptis* following 4-year dry storage. **Plant Biology**, v.21, n.1, p.1-9.
- Hengling, M. M. (2015). Armazenamento de sementes de orquídeas em diferentes condições de temperatura e umidade. **Ciência Florestal**, v. 25, n. 1, p. 101-110.
- Mohanty, C.R.; & Salem, P. (2017). **In vitro seed culture studies in Dendrobium orchid c.v. Banyat Pink**. **Journal Orchid Society of India**, v.31, p.93-96.
- Mora-Herrera, M.E.; Olivares-Aguilar, J.M.; Reyes-Araujo, D.Y.; Ceballos-Vásquez, S.E.; García-Velasco, R. (2025). Avaliação do ácido salicílico na aclimação ex vitro de microplantas de *Laelia autumnalis* (Lex.) Lindl., *Epidendrum* sp. e *Encyclia* sp.. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, v.28, n.1, p.1-13.
- Murasige, T.; & Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473–497.
- Nikishina, T.V.; Popova, E.V.; Vakhrameeva, M.G.; Varlyginab, T. I.; Kolomeitsevac, G. L.; Burovd, A.V.; Popovicha, E.A.; Shirokovd, A. I.; Shumilova, V.Y.U.; & Popo, A.S. (2007). Cryopreservation of seeds and protocorms of rare temperate orchids. **Russian Journal of Plant Physiology**, v.54, n.1, p.121-127.





- Paul, S.; Kumaria, S.; & Tandon, P. (2012). An effective nutrient medium for asymbiotic seed germination and large-scale in vitro regeneration of *Dendrobium hookerianum*, a threatened orchid of northeast India. **AoB Plants**, v.3, p.1-17.
- Popova, E.; Kim, H.H.; Saxena, P.K.; Engelmann, F.; & Pritchard, H.W. (2016). Frozen beauty: The cryobiotechnology of orchid diversity. **Biotechnology Advances**, v.34, n.4, p.380-403.
- Pritchard, H.W.; & Seaton, P.T. (1993). Seed storage behaviour in orchids: a review. **Seed Science Research**, v.3, n.1, p.1-11.
- Pritchard, H.W.; & Seaton, P.T. (1999). Seed storage behaviour in orchids: a review. **Seed Science Research**, v.9, n.2, p.1-11.
- Pritchard, H.W.; Nadarajan, J.; Ballesteros, D.; & Kettle, C. J. (2020). Cryopreservation of orchid seeds: advances and perspectives. **Plant Cell Reports**, v. 39, p. 123–135.
- Pritchard, H.W.; Seaton, P.T.; & Albrecht, L. (2014). Cryopreservation of tropical orchid seeds for long-term conservation. **Acta Botanica**, v.18, n.4, p.389-403.
- Pritchard, H.W. (2014). Long-term conservation of orchid seeds using cryogenic techniques. **Seed Science Research**, v. 24, p. 47-55.
- Pritchard, H.W.; & Nadarajan, J. (2008). Cryopreservation of orchid seeds: advances and challenges. **Annals of Botany**, v. 102, p.587-597.
- Pritchard, H.W.; Poynter, A.L.C.; & Seaton, P.T. (1999). Inter-specific variation in orchid seed longevity in relation to ultra-drying and cryopreservation. **lindleyana**, v.4, p.92–101.
- Pujasatria, G.C.; Miura, C.; & Kaminaka, H. (2020). In Vitro Symbiotic Germination: A Revitalized Heuristic Approach for Orchid Species Conservation. **Plants**. v.9, n.12, p.1742.
- Puspitaningtyas, D.M.; Handini E. (2021). Seed germination evaluation of *phalaenopsis amabilis* in various media for long-term conservation. **Biodiversitas**, v.22, n.11, p.5231–5238.
- Puspitaningtyas, D.M.; Handini, E. (2014). Orquídea armazenamento de sementes de *Coelogyne* spp. para conservação *ex situ*. *Boletim Kebun Raya*, v. 17, n. 2, p. 101-112.
- Puspitaningtyas, D.M.; & Handini, E. (2020). Conservação *ex situ* de *Cymbidium finlaysonianum* por meio do armazenamento de sementes. **Biodiversitas**, v.21, n.8, p.3519-3524.
- Quijia-Lamiña, P.H.; Baquero, L.E.; Kane, M.E.; Zettler, L.W. (2023). Symbiotic Seed Germination and Seedling Development of *Epidendrum geminiflorum* Knuth from Ecuador. **Diversity**, v.15, n.2, p.122-127.
- Ray, H.; & Vendrame, W. (2015). Orchid Pollination Biology. **EDIS**, v.15, n.6, p.6-11.





- Roberts, D.L.; & Dixon, K.W. (2008). Orchids. **Current Biology**, v.18, n.8, p.325–329.
- Santos, S.A.D.; Smidt, E.D.C.; Padial, A.A.; & Ribas L.L.F. (2016). Asymbiotic seed germination and in vitro propagation of *Brasiliorchis* sp.. **African Journal of Biotechnology**, v.15, n.6, p.134-144.
- Schwabe, W.W. (1981). Book Reviews. *Journal of Experimental Botany*. v.32, n.5, p.1117–1119.
- Scientific electronic Library Online (SciELO Brasil). (2006). Armazenamento de sementes de orquídeas. **Acta Botânica Brasílica**, v.20, n.3, p.345-351.
- Seaton, P. T.; & Pritchard, H.W. (2013). Long-term storage and germination of orchid seeds. *Seed Science and Technology*, v. 41, n. 3, p. 542-553.
- Seaton, P.; & Ramsay, M. (2005). Growing **Orchids from Seed**. Royal Botanic Gardens, Kew. 96pp,
- Seaton, P.; & Ramsay, M. (2009). **Cultivo de orquídeas por semillas**. Richmond, Surrey, UK: Royal Botanic Gardens, Kew. 123p.
- Seaton, P.T.; Hosomi, S.T.; Custódio, C.C.; Marks, T.R.; Machado-Neto, N.B.; Pritchard, H.W. (2018). Orchid Seed and Pollen: A Toolkit for Long-Term Storage, Viability Assessment and Conservation. In: Lee, YI., Yeung, ET. (eds) **Orchid Propagation: From Laboratories to Greenhouses—Methods and Protocols. Springer Protocols Handbooks**. Humana Press, New York, NY, p.123.
- Seaton, P.T.; Pritchard, H.W. (2013). Long-term storage and germination of orchid seeds. *Seed Science and Technology*, v.41, n.3, p.542-553.
- Shao, S. C.; Burgess, K. S.; Cruse-Sanders, J. M.; Liu, Q.; Fan, X. L.; Huang, H.; & Gao, J. Y. (2017). Using In Situ Symbiotic Seed Germination to Restore Over-collected Medicinal Orchids in Southwest China. **Frontiers in Plant Science**. v. 8, p.1-16.
- Soares, J. S.; Rosa, Y. B. C. J.; Tatara, M. B.; Sorgato, J. C.; & Lemes, C. S. R. (2014). Identificação da viabilidade de sementes de orquídeas pelo teste de tetrazólio. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 35, n. 5, p. 2275- 2284.
- Swarts, N.D.; & Dixon, K.W. (2017). Terrestrial orchid conservation in the age of extinction. **New Phytologist**, v.213, n. 4, p.1-15.
- The Plant List. (2020). Available online: www.theplantlist.org (accessed on 23 September 2020).
- Utami, E. S. W.; & Hariyanto, S. (2020). Organic Compounds: Contents and Their Role in Improving Seed Germination and Protocorm Development in Orchids. **International Journal of Agronomy**. v.3, p. 1–12.
- Valencia-glushchenko, N.; Oña-Arias, C.G.; Orellana, M.; Ortega, M.; Montero-Oleas, A.; & Torres, M.L. (2024). Germinação assimbiótica de sementes in vitro e desenvolvimento de mudas de quatro orquídeas equatorianas ameaçadas de extinção: *Epidendrum*





Jamiesonis, Pleurothallis pulchella, Oncidium pentadactylon e *Elleanthus capitatus*. *Plant Cell Tiss Organ Culture*, v. 158 , p.60.

Verma, J.; Sharma, K.; Thakur, K.; Sembi, J. K.; & Vij, S.P. (2014). Study on seed morphometry of some threatened Western Himalayan orchids. **Turkish Journal of Botany**, v.38, p.234– 251.

Vudala, S.M.; & Ribas L.L.F. (2017). Seed storage and asymbiotic germination of *Hadrolaelia grandis* (Orchidaceae). **South African Journal of Botany**, v.108, p.1-7.

WFO Plant List. (2025). Available online: <https://wfoplantlist.org/taxon/wfo-7000000429-2024-12?page=1>(accessed on 18 June 2025).

Zeng, S.J.; Chen, Z.I.; Wu, K.L.; Zhang, J.X.; Bai, C.K.; Teixeira da Silva, J.A.; & Duan J. (2011). Asymbiotic seed germination, induction of calli and protocorm-like-bodies, and in vitro seedling development of rare and endangered *Nothodoritis zhejiangensis* Chinese Orchid. **Horticultural Science**, v.46, p.460-465.

Zoubi, LA. (2024). Complexities and Innovations in Orchid Germination: A Review of Symbiotic and Asymbiotic Techniques. **Journal of Plant Sciences**, v. 12, n. 4, p. 90-94.

Received: 7.1.2025

Accepted: 7.25.2025

