

Criopreservação de sementes da orquídea brasileira em extinção *Cattleya granulosa* Lindl.

Ana Beatryz Prenzier Suzuki¹, Douglas Junior Bertoncilli¹, Guilherme Augusto Cito Alves¹
& Ricardo Tadeu de Faria¹

¹ Universidade Estadual de Londrina, Departamento de Agronomia, Centro de Ciências Agrárias, Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445 Km 380, Londrina - PR, CEP 86055-900. ana.suzuki@live.com; dj_bertoncilli@hotmail.com; guilhermecito@hotmail.com; faria@uel.br.

Recebido em 01.VI.2016

Aceito em 20.VII. 2018

DOI 10.21826/2446-8231201873206

RESUMO – O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito de crioprotetores na criopreservação de sementes de *Cattleya granulosa* Lindl. Foi utilizado delineamento inteiramente casualizado com um controle e cinco tratamentos com 10 repetições. Os tratamentos foram: C– controle (sem solução crioprotetora); T1-glicerol; T2-sacarose; T3-glicerol+sacarose; T4- PVS2 (Plant vitrification solution) e T5-PVS2+1% de floriglucinol. As sementes foram imersas em nitrogênio líquido a -196 °C. Após 15 dias, foram retiradas do nitrogênio. Uma parte foi submetida ao teste de tetrazólio para avaliar a viabilidade do embrião e outra foi semeada em frascos de vidro contendo meio de cultura para germinação *in vitro*. A germinação das sementes foi avaliada após 60 dias por meio da formação de protocormos. Aos 180 dias, foi avaliada a altura das plântulas e massa seca. As sementes conservadas em PVS2 e PVS2 + floriglucinol foram as que apresentaram maior viabilidade após a criopreservação, com 59% e 60% respectivamente.

Palavras-chave: conservação, *Orchidaceae*, vitrificação

ABSTRACT – Seed cryopreservation of the endangered Brazilian orchid *Cattleya granulosa* Lindl. The aim of this study was to evaluate the effect of cryoprotectants in cryopreservation of the orchid *Cattleya granulosa* Lindl. The experimental design was completely randomized with six treatments and 10 replicates: T1 - without cryoprotective solution; T2-glycerol; T3-sucrose; T4-glycerol + sucrose; T5-PVS2; and T6-PVS2 + 1% phloroglucinol. The seeds were treated with cryoprotectant solutions and immersed in liquid nitrogen at -196 °C. After 15 days, they were removed from the nitrogen and one part was subjected to the tetrazolium test to assess the viability of the embryo, and another was placed in vials for *in vitro* germination. Seed germination was measured after 60 days by the frequency of protocorm formation. After 180 days we evaluated seedling height and dry mass. The seeds stored in PVS2 and PVS2 + phloroglucinol for 10 minutes at 0°C showed the greatest viability after cryopreservation with 59.56% and 60.10%, respectively.

Keywords: conservation, *Orchidaceae*, vitrification

INTRODUÇÃO

As orquídeas representam o maior grupo entre as angiospermas, possuindo aproximadamente 25 mil espécies e 800 gêneros, com distribuição por todo o mundo, porém sua maior diversidade é identificada nos trópicos (Dressler 2005). No Brasil são encontrados 238 gêneros e 2.553 espécies (Barros *et al.* 2015), sendo o terceiro maior país em número de espécies, ficando atrás de Colômbia e Equador (Dressler 1981).

Provavelmente a grande amplitude geográfica da sua distribuição seja favorecida pela dispersão a longas distâncias, proporcionada por suas numerosas e diminutas sementes. Em seus habitats naturais das áreas tropicais ou subtropicais, as orquídeas epífitas crescem em troncos e forófitos sob uma carregada cobertura de folhas (Benzing 1981).

Algumas espécies têm grande importância econômica, como a baunilha extraída dos frutos de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews; outras espécies possuem alto valor ornamental, como algumas espécies de *Cattleya*, *Phalaenopsis*, *Dendrobium*, entre outras (Judd *et al.* 2009).

O comércio de orquídeas nativas teve como prática o extrativismo que, aliado à destruição de seus habitats naturais pelo avanço da agropecuária, levou à extinção ou à quase extinção de muitas espécies, dentre elas *Cattleya granulosa* Lindl.

Segundo Barros *et al.* (2015), a *C. Granulosa* Lindl. é uma espécie endêmica do Brasil, com domínio fitogeográfico na mata atlântica e ocorrência confirmada nos Estados de Alagoas, Bahia, Pernambuco, Rio Grande do Norte e Pernambuco, mas há indicações de sua existência também no estado do Espírito Santo. É uma planta rizomatosa de pseudobulbo cilíndrico com duas folhas por pseudobulbo e uma a quatro flores de coloração castanha.

A vulnerabilidade em relação à extinção de *C. granulosa* ocorre em razão do desenvolvimento das cidades, que fragmenta seu habitat, além da pressão da coleta predatória decorrente de seu valor ornamental. Estima-se uma redução de 30% na população madura nos próximos 30 anos caso persista o ritmo de extração atual nas áreas naturais (Martinelli & Moraes 2013).

Nos últimos anos, a criotecnologia tem conquistado grande destaque, tanto na medicina reprodutiva humana e animal, quanto na preservação de espécies vegetais ameaçadas ou não de extinção, com a criopreservação de sementes e outras partes como embriões, pólen, tecidos e células. A criopreservação tem como princípio básico a redução da temperatura com a finalidade de desacelerar o metabolismo celular, permitindo que sementes e tecidos sejam conservados por períodos indeterminados, o que possibilita a retomada do desenvolvimento celular normal após o armazenamento em nitrogênio líquido a -196°C (Pegg 2007).

As técnicas utilizadas em plantas são, o controle da taxa de refrigeração, vitrificação, encapsulamento, desidratação e preservação da gema dormente (Reed 2008). Estas técnicas promovem o armazenamento simultâneo de diversas partes da orquídea. Para sementes, a técnica de vitrificação tem mostrado um maior potencial de tolerância ao estresse causado pela criopreservação (Merritt 2014). No entanto, o sucesso da criopreservação depende de uma delicada e complexa interação entre importantes variáveis, que envolve tanto questões físicas, como o volume da solução de criopreservação e as taxas de resfriamento, quanto questões químicas referentes à composição da solução de criopreservação.

Para reduzir ou evitar as injúrias induzidas pelas baixas temperaturas, é essencial a adição de substâncias que proporcionem uma crioproteção celular e tecidual durante a redução da temperatura (Vajta *et al.* 2007). Essas substâncias, conhecidas como agentes crioprotetores (ACPs), são fundamentais para os resultados satisfatórios na criopreservação. Embora os ACPs sejam absolutamente necessários e amplamente utilizados nos protocolos de criopreservação, os mecanismos que conferem proteção ao material biológico, bem como a toxicidade e a metabolização celular destes agentes não são completamente esclarecidos e abordados na literatura, principalmente quando se trata da criopreservação de orquídeas.

Em orquídeas, a criopreservação tem sido relatada em diversos estudos (Pritchard 1984, Pritchard *et al.* 1999, Popova *et al.* 2003) e a vitrificação tem sido o método mais comumente utilizado para criopreservar protocormos, embriões zigóticos e células em suspensão (Ishikawa *et al.* 1997, Wang *et al.* 1998, Tsukazaki *et al.* 2000). A criopreservação foi empregada para plântulas *in vitro* de *Dendrobium* cultivar Walter Oumae (Lurswijidjaru & Thammasiri 2004), sementes (Galdiano Júnior *et al.* 2014) e pólen de híbridos de *Dendrobium* (Vendrame *et al.* 2007, Vendrame *et al.* 2008) e protocormos de *Dendrobium* (Yin & Hong 2009).

Apesar da vitrificação ser relatada como um método bem sucedido para a criopreservação de células, órgãos e tecidos, é importante ressaltar que soluções de vitrificação apresentam efeitos tóxicos para muitas plantas, o que requer um tratamento cuidadoso (Vendrame & Faria 2011).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar diferentes soluções crioprotetoras na criopreservação em nitrogênio líquido de sementes da orquídea brasileira *Cattleya granulosa*.

MATERIAL E MÉTODOS

As sementes de *Cattleya granulosa* foram obtidas por polinização artificial de plantas cultivadas em estufa do departamento de Agronomia da Universidade Estadual de Londrina. As flores foram polinizadas em julho de 2015 uma semana após a antese, e as cápsulas formadas foram colhidas maduras sete meses após a polinização.

As cápsulas fechadas foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio a 3% durante 20 minutos. Em seguida, foram abertas e as sementes extraídas em câmara de fluxo laminar. O teor de água foi obtido pelo método de estufa a $105\pm 3^{\circ}\text{C}$ conforme especificações das Regras para Análise de Sementes, assim como a viabilidade inicial das sementes, através do teste de tetrazólio (Brasil 2009).

O teste de tetrazólio foi realizado colocando-se as sementes em água destilada por um período de 24 horas a 25°C para que ocorresse a hidratação das sementes. Em seguida, a água foi retirada e adicionada à solução de tetrazólio a 1%. As sementes permaneceram por mais 24 horas sob temperatura de 30°C e, com auxílio de uma lupa estereoscópica e o software MoticImages Plus 2.0ML, foi possível avaliar a viabilidade das sementes.

Os tratamentos consistiram na imersão de sementes de *C. granulosa* em diferentes soluções crioprotetoras autoclavadas, sendo T1 - glicerol 2M; T2 - sacarose 0,4 M; T3 - glicerol 2M + sacarose 0,4M; T4 - PVS2 (plant vitrification solution 2); T5 - PVS2 + 1% de floroglucinol; e um controle (C), sem nenhum tipo de solução crioprotetora. Para cada tratamento e o controle, 5mg de sementes foram pesadas, em balança de precisão dentro de câmara de fluxo laminar. As sementes foram acondicionadas em criotubos de 2mL contendo as diferentes soluções, de acordo com os tratamentos.

Os tratamentos T1, T2 e T3 foram expostos às soluções por 20 minutos a temperatura de 25°C e posteriormente imerso em nitrogênio líquido. Nos tratamentos T4 e T5, que continham a solução de PVS2, as sementes foram expostas, a solução, por 10 minutos em banho de gelo (0°C), com posterior imersão em nitrogênio líquido. A solução de PVS2 continha 30% de glicerol (v/v), 15% de etileno glicol (v/v) e 15 % de dimetilsulfóxido – DMSO (v/v) adicionada ao meio nutritivo MS contendo metade da concentração de sais e sacarose 0,4M (pH 5,7) (Sakai *et al.* 1990)

Os criotubos contendo as sementes tratadas, assim como os criotubos contendo as sementes do controle foram armazenados em nitrogênio líquido sob temperatura de -196°C durante 15 dias. Após a retirada das sementes do nitrogênio líquido, a recuperação ocorreu por descongelamento em aparelho banho-maria sob temperatura de 40°C durante 1,5 min. O conteúdo dos criotubos foi recuperado e as sementes separadas das soluções de por meio de lavagem, com água destilada e autoclavada, por três vezes em câmara de fluxo laminar.

Uma parte das sementes foi submetida ao teste de tetrazólio para avaliação da viabilidade do embrião após o congelamento, e a outra parte disposta em 10 frascos

cada tratamento para cultivo *in vitro* contendo 50 mL por frasco de meio MS (Murashige & Skoog 1962) modificado com a metade da concentração de macronutrientes com pH ajustado para 5,8 e solidificado com ágar 0,6%. Os frascos contendo as sementes foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de 25°C e iluminação controlada com 16 horas de luz e intensidade luminosa de 28 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para germinação.

Após 60 dias, a germinação das sementes foi avaliada por meio da frequência da formação de protocormos. Aos 180 dias após a germinação (DAG), foram avaliadas a sobrevivência dos protocormos, a altura e a massa seca das plântulas.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com seis tratamentos e 10 repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% (Zar 2014).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na avaliação realizada para caracterizar o lote das sementes após a abertura da cápsula de *Cattleya granulosa* observou-se que as sementes apresentaram $75 \pm 2,22\%$ de sementes viáveis e teor de água de 5,12%. As sementes, quando observadas em lupa estereoscópica, continham embriões bem formados e foi possível avaliar sua viabilidade pela coloração vermelha obtida através do teste de tetrazólio (Figs. 1-3).

As sementes tratadas com PVS2 (T5) e PVS2 + floroglucionol (T6) foram as que apresentaram maior viabilidade após a criopreservação, determinada pelo teste de viabilidade com sal de tetrazólio a 1% (Fig. 4).

Galdiano Junior *et al.* (2012), trabalhando com híbrido de *Dendrobium*, observaram que os tratamentos utilizando PVS2 com floroglucionol 1% e PVS2 com floroglucionol 1% e Supercool X1000 foram os que apresentaram maior porcentagem de sementes viáveis após a criopreservação. Vendrame *et al.* (2007), trabalhando com híbridos de *Dendrobium*, observaram que o PVS2 na vitrificação de sementes antes do congelamento resultou em 47 a 63% de sementes viáveis após o descongelamento.

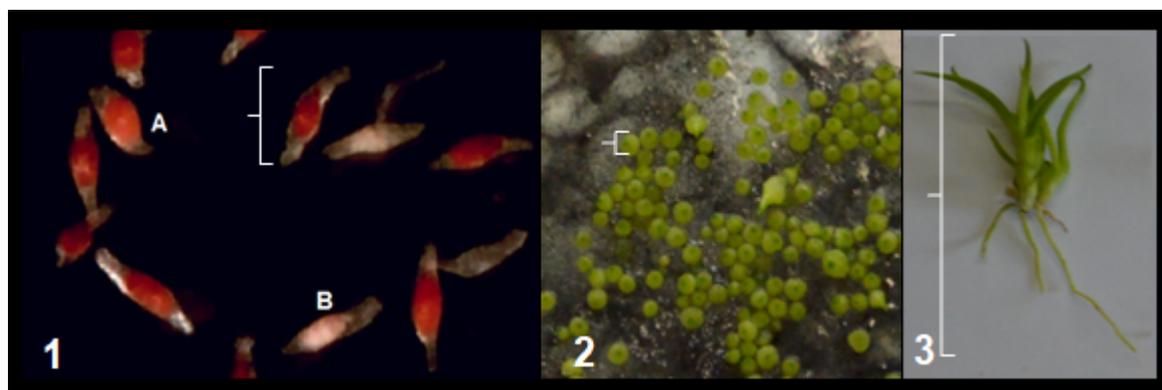
Por outro lado, a menor porcentagem de sobrevivência foi observada nos tratamentos T1 com glicerol 2M, T2 com sacarose 0,4 M e T3 com glicerol 2M + sacarose 0,4M (Fig. 2). Em estudo semelhante, Ferrari (2016) testando diferentes soluções crioprotetores na criopreservação de sementes de *Cattleya labiata*, observou que as sementes quando tratadas com soluções de sacarose 0,4M e glicerol 2M obtiveram os menores valores de viabilidade.

A formação de protocormos apresentou resultados estatisticamente semelhantes aos resultados encontrados no teste de tetrazólio. A sobrevivência das sementes foi maior nos tratamentos T4 (PVS2) com 57% e T5 (PVS2 + floroglucionol) com 62% de sobrevivência. A mensuração da massa seca, mostrou um melhor resultado no controle, com 9,54 mg. As alturas das plantas apresentaram resultados estatisticamente semelhantes entre controle, e os tratamentos T4 e T5, com 2,05 cm, 2,06 cm e 2,05 cm respectivamente (Tab. 1).

Resultado semelhante foi observado por Galdiano Junior *et al.* (2014), trabalhando com sementes do híbrido de *Dendrobium* “Dong Yai”, os quais observaram que sementes tratadas com PVS2 pelo período de 1 a 3 horas apresentou maior porcentagem de germinação (entre 51 e 58%).

Segundo Nikishina *et al.* (2007), as taxas de germinação de sementes após a sua exposição ao nitrogênio líquido variam conforme a espécie, e pode ser menor ou maior do que no controle sendo a eficiência dos crioprotetores variando em função da estrutura (célula ou tecido) a ser criopreservada (Fuller & Paynter 2004), do tipo, concentração e tempo de exposição utilizado antes do processo de criopreservação propriamente dito.

O uso de PVS2 isoladamente como um crioprotetor possibilitou 57% de viabilidade das sementes e o PVS2+floroglucionol permitiu 62% de sobrevivência das sementes de *C. granulosa*, sendo estes, os tratamentos que apresentam os melhores resultados (Tab. 1). Houve perda da viabilidade das sementes no controle e nos demais tratamentos T1 (Glicerol 2M), T2 (Sacarose 0,4M) e T3 (Glicerol 2M + Sacarose 0,4M), os quais apresentaram 48, 38, 38 e 40% de viabilidade, respectivamente. Estes resultados podem ser visualizados tanto no teste de tetrazólio como na germinação das sementes.



Figs. 1-3. Sementes de *Cattleya granulosa* submetidas a teste de tetrazólio para verificar a sobrevivência do embrião. 1. Embrião viável (A); Embrião não viável (B); 2. Germinação das sementes e formação de protocormos 60 DAS; 3. Aspecto das plantas aos 180 DAG. Barras: Fig.1 = 0,1 cm; Fig. 2 = 0,3cm; Fig.3 = 4,2cm

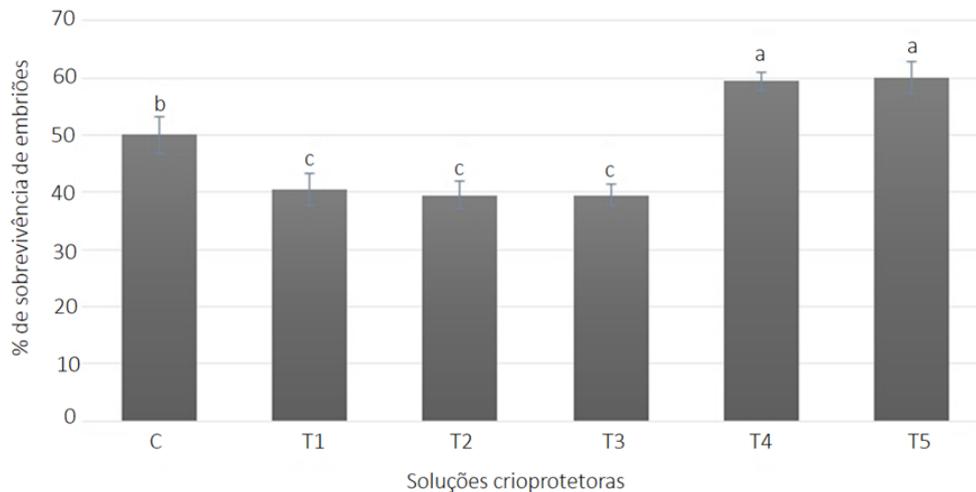


Fig. 4. Porcentagem de sobrevivência das sementes de *Cattleya granulosa* Lindl. referente aos tratamentos com diferentes soluções crioprotetoras, submetidas ao teste de tetrazólio a 1% após 15 dias de imersão em Nitrogênio Líquido: C = controle (sem solução crioprotetora), T1 = glicerol 2M, T2 = sacarose 0,4 M, T3 = glicerol 2M + sacarose 0,4M, T4 = PVS2, T5 = PVS2 + 1% de floroglucinol. Valores representam as médias de dez contagens independentes. Médias na coluna seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p = 0,05$).

Tabela 1. Porcentagem de sobrevivência de protocormos (P) 60 dias após a semeadura (DAS) de *Cattleya granulosa*, massa seca (MS) e altura (ALT) de plântulas, 180 dias após a germinação (DAG), referente aos tratamentos em diferentes soluções crioprotetoras utilizadas antes da imersão em NL. P = Protocormos; MS = Massa seca; ALT = Altura; DAS = Dias após a semeadura; DAG = Dias após a germinação; NL = Nitrogênio líquido. Médias na coluna seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p = 0,05$).

Tratamentos	P (%)	MS (mg)	ALT (cm)
	60 DAS	180 DAG	
C - controle (sem solução crioprotetora)	48 b	9,54 a	2,05a
T1 - glicerol 2M (20 min a 25°C)	38 c	7,02c	1,67b
T2 - sacarose 0,4 M (20 min a 25°C)	38 c	7,39c	1,80b
T3 - glicerol 2M + 0,4M sacarose (20 min a 25°C)	40 c	7,38c	1,79b
T4 - PVS2 (10 min a 0°C)	57 a	8,47b	2,06a
T5 - PVS2 + 1% de floroglucinol (10 min a 0°C)	62 a	8,72b	2,05a
C.V. %	10,43	5,59	6,05

Não houve diferença entre o controle e os tratamentos T4 (PVS2) e T5 (PVS2 + floroglucinol 1%) ao se analisar a altura das plântulas. Já para massa seca, o tratamento controle, foi o que apresentou os maiores valores (Tab. 1). Esse resultado pode ser consequência da toxicidade dos crioprotetores para as células, ocasionando menor acúmulo de massa seca.

Segundo Vajta *et al.* (2007), para reduzir ou evitar as injúrias induzidas pelas baixas temperaturas, é essencial a adição de substâncias que proporcionem uma crioproteção celular e tecidual durante a redução da temperatura. O estado vítreo traz vários benefícios para a célula desidratada, pois limita a perda de água, reduz a cristalização de sais e proteínas no citoplasma, protege contra mudanças no pH e previne o colapso celular quando a desidratação é excessiva (Carvalho 2006). De acordo com Vendrame *et al.* (2014), na criopreservação de orquídeas, a solução de PVS2 é o crioprotetor mais comumente utilizado para criopreservar sementes.

Os crioprotetores são substâncias químicas que reduzem a injúria sofrida pela célula durante os processos de congelamento e descongelamento. Os mais comumente utilizados e capazes de passar pelas membranas celulares são o etileno glicol, glicerol e dimetilsulfóxido (DMSO) dentre outros. Entretanto, esses crioprotetores podem apresentar

efeito tóxico ou podem causar estresse osmótico, levando as células à morte, ou a modificar sua resposta morfogenética (Day & McLellan 1995). Alguns autores relataram os efeitos tóxicos que o glicerol pode exercer, como alterações físico-químicas, podendo levar à ruptura da membrana plasmática, à remoção de importantes proteínas membranárias, bem como, induzir modificações na estabilidade da estrutura lipídica (Watson 1995, Curry 2000).

O tratamento do material com a solução de PVS2 é uma das etapas mais importantes na criopreservação e é crítica para sua sobrevivência, permitindo a redução do teor de água nas células, o que evita os danos físicos causados pela formação dos cristais de gelo durante o congelamento (Sakai *et al.* 1990). Os tratamentos realizados antes da criopreservação têm se mostrado essenciais para a sobrevivência do material ao processo de congelamento (Vendrame *et al.* 2014).

Os melhores resultados obtidos com a solução crioprotetora de PVS2 podem ser atribuídos à presença de dimetilsulfóxido (DMSO), o qual interage com as membranas, atravessando-as rapidamente por meio de difusão. O DMSO, em concentrações de 20 % ou menores, pode ser utilizado como anticongelante, já que sua ligação com o hidrogênio tende a formar uma matriz cristalina. Ela tem efeito crioprotetor, evitando a cristalização da água e

removendo os radicais livres liberados durante o processo de descongelamento (Sturion *et al.* 1999).

Outra substância encontrada na solução de PVS2 é o etilenoglicol que, segundo Arruda (2000), tem propriedades crioprotetoras semelhantes ao DMSO. Entretanto Guthrie *et al.* (2002), relatam que a molécula tratada com etilenoglicol produz um menor estresse osmótico que o glicerol. Portanto, acredita-se que a solução de PVS2 obteve os melhores resultados, por ter em sua formulação a combinação de DMSO e etilenoglicol.

O sucesso da criopreservação das sementes de *Cattleya granulosa* Lindl. depende do tratamento com soluções crioprotetoras antes da imersão em nitrogênio líquido, sendo que os tratamento sem solução de PVS2 ou PVS2+fluroglucinol proporciona maior sobrevivência das sementes.

REFERÊNCIAS

- Arruda, R.P. 2000. Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para espermatozóide eqüino pelo uso de microscopia de epifluorescência, clítmometria de fluxo análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfologia (ASMA). Tese 85 f. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo.
- Barros, F. Vinhos, F. Rodrigues, V.T. Barbacena, 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. 2015. Orchidaceae *In* Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB11312>. Acessado em 06.06.2016.
- Benzing, D.H. 1981. Why is Orchidaceae so large, its seeds so small, and its seedlings mycotrophic? *Selbyana* 5(3):241-242.
- Brasil. 2009. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para análise de sementes. Brasília, p. 307-324.
- Carvalho, V.S. 2006. Criopreservação de sementes e pólen de orquídeas. Tese 82 f. Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.
- Curry, M.R. 2000. Cryopreservation of semen from domestic live stock. *Reviews of Reproduction* 5:46-52.
- Day, J.G. & McLellan, M.R. 1995. Protein Phosphatase Protocols: Cryopreservation and Freezing-Drying Protocols. Humana Press, New York, 208 p.
- Dressler, R.L. 1981. The Orchids - Natural history and classification. Harvard University Press Cambridge. 332p.
- Dressler, R.L. 2005. How Many Orchids Species. *Selbyana* 26:155-158.
- Ferrari, E.A.P. 2016. Criopreservação de sementes de orquídeas brasileiras. Tese 68 f. Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná.
- Fuller, B. & Paynter, S. 2004. Fundamentals of cryobiology in reproductive medicine. *Reproductive BioMedicine Online* 9:680-869.
- Galdiano Júnior, R.F., Lemos, E.G.M., Faria, R.T. & Vendrame, W.A. 2012. Cryopreservation of *Dendrobium* hybrid seeds and protocorms as affected by phloroglucinol and Supercool X1000. *Scientia Horticulturae* 148:154-160.
- Galdiano Júnior, 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 Biotechnology* 172:2521-2529.
- Guthrie, H.D., Liu, J. & Critser, J.K. 2002. Osmotic tolerance limits and effects of cryoprotectants on motility of bovine spermatozoa. *Biology of reproduction*, 67(6):1811-1816.
- Ishikawa, K., Harata, K., Mii, M., Sakai, A., Yoshimatsu, K. & Shimomura, K. 1997. Cryopreservation of zygotic embryos of a Japanese terrestrial orchid (*Bletilla striata*) by vitrification. *Plant Cell Reports* 16:754-757.
- Judd, W.S., Stevens, P.F., Kellogg, E.A., Donoghue, M.J. & Campbell, C.S. 2009. Sistemática vegetal: um enfoque filogenético. Artmed, Porto Alegre. 632 p.
- Lurswijidjaru, W. & Thammasiri, K. 2004. Cryopreservation of shoot tips of *Dendrobium Walter Oumae* by encapsulation/dehydration. *Science Asia Journal* 30:293-299.
- Martinelli, G. & Moraes, M.A. 2013. Livro vermelho da flora do Brasil. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 1100 p.
- Merritt, D.J., Hay, R.F., Swarts, N.D., Sommerville, K.D. & Dixon, K.W. 2014. *Ex situ* Conservation and Cryopreservation of Orchid Germplasm. *International Journal of Plant Sciences* 175(1):46-58.
- Murashige, T. & Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant, Copenhagen* 15:473-479.
- Nikishina, T.V., Popova, A.E.V., Vakhrameeva, M.G., Varlygina, T.I., Kolomeitseva, G.L., Burov, A.V., Popovich, E.A., Shirokov, A.I., Shumilov, V.Y.U. & Popov, A.S. 2007. Cryopreservation of seeds and protocorms of rare temperate orchids. *Russian Journal of Plant Physiology* 54:121-127.
- Pegg, D.E. 2007. Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols Methods. *In* Methods in Molecular Biology (J. D. Day & G. N. Stacey eds.). Humana Press, Totowa. p. 39-47.
- Pritchard, H.W. 1984. Liquid nitrogen preservation of terrestrial and epiphytic orchid seed. *Cryoletters* 5:295-300.
- Pritchard, H.W., Poynter, A.L.C. & Seaton, P.T. 1999. Interspecific variation in orchid seed longevity in relation to ultra-dry storage and cryopreservation. *Lindleyana* 14:92-101.
- Popova, E.V., Nikishina, T.V., Kolomeitseva, G.L. & Popov, A.S. 2003. The effect of seed cryopreservation on the development of protocorms by the hybrid orchid *Bratonia*. *Russian Journal Plant Physiology* 50:672-677.
- Reed, B.M. 2008. Cryopreservation – practical considerations. *In* Plant Cryopreservation: A Practical Guide (B.M. Reeds ed.). Springer, New York. p. 3-14.
- Sakai, A., Kobayashi, S. & Oiyama, I. 1990. Cryopreservation of nuclear cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. *Plant Cell Report* 9:30-33.
- Sturion, D.J., Pinheiro, E.R., Pardo, E. & Tanaka, N.M. 1999. Usos e controvérsias do dimetilsulfóxido (DMSO): na utilização em animais. *Científica, Ciências, Biologia e Saúde*, 1(1):41-47.
- Tsukazaki, H., Mii, M., Tokuhara, K. & Ishikawa, K. 2000. Cryopreservation of *Doritaenopsis* suspension culture by vitrification. *Plant Cell Report* 19:1160-1164.
- Vajta, G., Kuwayama, M. & Vanderzwalmen, P. 2007. Disadvantages and benefits of vitrification. *In* Vitrification in assisted reproduction a user's manual and troubleshooting guide (M. Tucker & J. Liebermann eds.). Informa Healthcare, London. p. 33-44.
- 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., Carvalho, V.S., Dias, J.M.M. & Maguire, I. 2008. Pollination of *Dendrobium* hybrids using cryopreserved pollen. *Scientia Horticulturae* 43(1):264-267.
- Vendrame, W.A. & Faria, R.T. 2011. Phloroglucinol enhances recovery and survival of cryopreserved *Dendrobium nobile* protocorms. *Scientia Horticulturae* 128(2):131-135.
- Vendrame, W., Faria, R.T., Sorace, M. & Sahyun, S.A. 2014. Review: Orchid Cryopreservation. *Ciência e Agrotecnologia* 38(3):213-229.
- Wang, J. H., Ge, J. G., Liu, F., Bian, H.W. & Huang, C.N. 1998. Cryopreservation of seeds and protocorms of *Dendrobium candidum*. *Cryoletters* 19:123-128.
- Watson, P.F. 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post thawing function. *Reproduction, Fertility and Development* 7:871-891.
- Yin, M. & Hong, S. 2009. Cryopreservation of *Dendrobium candidum* Wall. ex Lindl. protocorm-like bodies by encapsulation-vitrification. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 98(2):179-185.
- Zar, J.H. 2014. *Biostatistical Analysis*. Pearson Education Limited, Edinburgh Gate, England. 751p.