

---

## **CRIOPRESERVAÇÃO DE SEMENTES DE ORQUÍDEAS EPÍFITAS BRASILEIRAS EM NITROGÊNIO LÍQUIDO**

CRYOPRESERVATION OF ORCHID SEEDS BRAZILIAN EPIPHYTES IN LIQUID NITROGEN

Gianne Caroline Guidoni Stulzer<sup>1</sup>

Christina da Silva Wanderley<sup>2</sup>

Ana Beatriz Prenzier Suzuki<sup>3</sup>

Ricardo Tadeu de Faria<sup>4</sup>

Rodrigo Thibes Hoshino<sup>5</sup>

### **RESUMO**

As orquídeas compõem o grupo mais reconhecido em número de gêneros dentro das Angiospermas, porém o grande número de indivíduos não as torna menos sensíveis ao risco de extinção. A criopreservação vem sendo utilizada como método eficaz para a conservação de material biológico vegetal. O objetivo do trabalho foi avaliar soluções vitrificantes na criopreservação de sementes de *Cattleya forbesii* e *Cattleya walkeriana*. Sementes dessas duas espécies foram submetidas ao teste de tetrazólio para definir a germinação inicial, *C. forbesii* e *C. walkeriana* apresentavam 46,23% e 55,77%. Os tratamentos consistiram na imersão de 10 mg de sementes em diferentes soluções crioprotetoras: T1 - sem solução; T2 – PVS1- (10 min 0 C°); T3 – PVS2 (10 min 0 C°); T4 – PVS3 (10 min 0 C°). Após o tratamento, armazenou-se as sementes em nitrogênio líquido por 30 dias. A viabilidade foi reavaliada por teste de tetrazólio, em *C. forbesii* os resultados foram: T1 - 45,55%; T2 – 47,79%; T3 – 52,68%; T4 – 38,08%; e para *C. walkeriana* os resultados foram: T1 – 50,96%; T2 – 51,09%; T3 – 66,33%; T4 – 55,79%. As soluções vitrificantes denominadas PVS demonstraram capacidade de manter ou até melhorar a viabilidade das sementes, sendo a solução PVS2 capaz de quebrar a dormência das sementes das duas espécies. O uso das soluções PVS1 e PVS3 mantiveram a viabilidade inicial das duas espécies estudadas, embora não diferiram das sementes que não utilizaram nenhuma solução crioprotetora, e desta forma podem ser utilizadas em protocolos de criopreservação para as duas espécies estudadas.

128

**Palavras-chave:** Soluções vitrificantes. Nitrogênio líquido. *Cattleya forbesii*. *Cattleya walkeriana*.

---

<sup>1</sup> Eng. Agrônoma, formada pelo Centro Universitário Filadélfia (UniFil), Londrina – Pr. E-mail: g.caroline.stulzer@gmail.com

<sup>2</sup> Eng<sup>a</sup>. Agrônoma, docente no curso de graduação e pós-graduação em Agronomia da UniFil, Londrina – Pr.

<sup>3</sup> Eng<sup>a</sup>. Agrônoma, MSc Doutoranda (Fitotecnia) Departamento Agronomia - Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina - Pr.

<sup>4</sup> Eng. Agrônomo, Dr. Docente no Departamento de Fitotecnia, Centro de Ciências Agrárias - UEL, Londrina - Pr.

<sup>5</sup> Eng. Agrônomo, MSc Doutorando (Fitotecnia) Departamento Agronomia - UEL, Londrina - Pr.

## ABSTRACT

The Orchids are a family of flowering plants that is well known for its large diversity in species within the Angiosperms, but this diversity does not make them less sensitive to the risk of extinction. Cryopreservation has been used as an effective method for the conservation of plant biological materials. The objective of this study was to evaluate vitrification solutions in cryopreservation of *Cattleya forbesii* seeds and *Cattleya walkeriana*. Seeds of these two species were submitted to the tetrazolium test to set the initial germination, *C. forbesii* and *C. walkeriana* had 46.23% and 55.77%. The treatments consisted of immersion of 10 mg of seeds in different cryoprotectant solutions: T1 - no solution; T2 - PVS1- (10 min 0 C°); T3 - PVS2 (10 min 0 C°); T4 - PVS3 (10 min 0 C°). After treatment, the seeds were stored in liquid nitrogen for 30 days. Viability was re-evaluated by tetrazolium test in *C. forbesii* the results were: T1 - 45.55%; T2 - 47.79%; T3 - 52.68%; T4 - 38.08%; and *C. walkeriana* the results were: T1 - 50.96%; T2 - 51.09%; T3 - 66.33%; T4 - 55.79%. The vitrification solutions called PVS demonstrated the ability to maintain or even improve the viability of seeds. The PVS2 solution was able to break seed dormancy of both orchid species. The use of PVS1 and PVS3 solutions maintained the initial viability of the two species, and no differences were noticed with seeds that didn't receive any cryoprotectant solution, and therefore these solutions can be used in cryopreservation protocols for both orchid species.

**Keywords:** Vitrification solutions. Liquid Nitrogen. *Cattleya forbesii*; *Cattleya walkeriana*

129

## 1 INTRODUÇÃO

As orquídeas são plantas pertencentes à família Orchidaceae que dentro das Angiospermas compõe o grupo mais reconhecido em número de gêneros (JOLY, 1998). Porém o grande número de indivíduos não as torna menos sensíveis ao risco de extinção. O crescimento da população afeta diretamente o meio ambiente, ocupando as fronteiras entre a área rural e urbana (MARTINELLI; MORAES, 2013). A diversidade biológica fica assim ameaçada, e a perda dessa diversidade deve ser evitada e corrigida quando possível através de programas de conservação de germoplasma vegetal (SANTOS, 2000).

O gênero *Cattleya* possui mais de 70 espécies descritas, inúmeros híbridos, e grande parte das espécies são típicas da flora brasileira. O gênero foi descrito por John Lindley em 1824, e seu centro de origem são as Américas Tropical e Subtropical, entre o México e o Brasil. As plantas desse gênero são epífitas e com crescimento simpodial, suas flores vistosas e quase sempre muito perfumadas (TAKANE et al., 2010).

As espécies *Cattleya forbesii* e *C. walkeriana* são espécies nativas do Brasil, e encontram-se na lista de espécies ameaçadas de extinção. A Mata Atlântica, habitat original dessas plantas, encontra-se devastada, restando menos de 5% da sua cobertura original, sendo grande parte composta de fragmentos e de floresta secundária (MARTINELLI; MORAES, 2013).

As *Cattleya* têm alto valor ornamental, o que leva a seus exemplares silvestres sofrerem com o extrativismo predatório. Além disso, tem distribuição dentro de uma das áreas mais desenvolvidas economicamente do Brasil e, dessa forma, a perda e fragmentação de habitat são ameaças à sua população. Estudos genéticos indicaram que a hibridização desse gênero também tem sido uma ameaça, alterando drasticamente o fluxo gênico entre subpopulações (SANTOS, 2000; MARTINELLI; MORAES, 2013).

As sementes são a maneira natural das plantas se propagarem no ambiente de origem, e com elas é possível a manutenção da espécie por longos períodos de tempo. Programas de melhoramento genético visam aperfeiçoar técnicas que aumentem e mantenham a qualidade do material biológico aumentando a longevidade da semente de forma previsível (SANTOS, 2000). Estabelecer bancos de sementes para a preservação de espécies ameaçadas de extinção é de suma importância (SUZUKI et al., 2015).

Pesquisas na área de criobiologia estão sendo conduzidas a pouco mais de dez anos, na tentativa de elucidar os mecanismos biológicos que controlam a tolerância ao estresse sofrido pelo germoplasma ao ser congelado e descongelado, e assim refinar e simplificar cada vez mais essa técnica (SANTOS, 2001; VENDRAME et al., 2014).

A criopreservação vem sendo utilizada como método eficaz para a conservação de material biológico vegetal. Esse método induz a planta a entrar em um estado de paralisação celular, mas mantém a estrutura celular e o material genético perfeito, assim após o descongelamento tem suas atividades metabólicas restabelecidas sendo possível a partir desse material produzir novas plantas saudáveis e viáveis. O ponto crucial neste processo é o teor de água que o material a ser criopreservado possui, pois, a desidratação excessiva da célula pode levar a morte e o acúmulo de água leva a formação de cristais de gelo no interior celular, podendo

causar o rompimento das membranas celulares, levando à célula a morte (VENDRAME et al., 2014).

A utilização de soluções crioprotetoras é fundamental para que as sementes tolerem temperaturas ultrabaixas ao serem armazenadas em nitrogênio líquido- NL. As técnicas de criopreservação desenvolvidas mais recentemente são mais simples e estão baseadas na vitrificação que é o processo através do qual a água sofre uma transição da fase líquida para estado sólido amorfo e meta estável (SANTOS, 2001).

As soluções vitrificantes intracelulares mais utilizadas são denominadas PVS (Plant Vitrification Solution) à base de DMSO (dimetilsulfóxido), etilenoglicol, metanol, sorbitol, glicerol e propileno-glicol, ao desidratar a célula, esses compostos formam uma solução altamente concentrada, entretanto possuem certa citotoxicidade, causam estresse osmótico e podem acarretar a morte celular. Outras soluções vitrificantes utilizam açúcares como agente osmótico extracelular, com grande efeito protetor, ou atuando como substituto da água removida mantendo as estruturas e evitando a perda de funcionalidade (SANTOS, 2001).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar diferentes soluções vitrificantes na criopreservação de sementes de *C. forbesii* e *C. walkeriana*.

131

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

As sementes de *Cattleya forbesii* Lindley (1826) e *Cattleya walkeriana* Gardner (1839) utilizadas foram obtidas por polinização artificial de plantas cultivadas em estufa. As flores foram polinizadas uma semana após a antese e as cápsulas formadas foram colhidas maduras após cinco meses.

As cápsulas fechadas foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio a 3% durante 20 minutos. As cápsulas foram abertas e as sementes retiradas em câmara de fluxo laminar. O teor de umidade foi obtido pelo método de estufa, conforme especificações das Regras para Análise de Sementes, assim como a viabilidade inicial das sementes, por meio do teste de tetrazólio (BRASIL, 2009).

O teste de tetrazólio em orquídeas foi realizado colocando 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 Motic Images Plus 2.0ML, foi possível avaliar a viabilidade das sementes (SUZUKI et al., 2015).

Os tratamentos consistiram na imersão de sementes das duas espécies em diferentes soluções crioprotetoras: T1 - sem solução crioprotetora; T2 – PVS1-(Plant Vitrification Solution) (10 min 0 °C) é composta de 220 g.L<sup>-1</sup> de glicerol, 150 g.L<sup>-1</sup> de etilenoglicol, 150 g.L<sup>-1</sup> de propilenoglicol, 70 g.L<sup>-1</sup> de DMSO e 91 g.L<sup>-1</sup> de sorbitol ; T3 – PVS2 (10 min 0 °C) composta por meio MS (MURASHIGE E SKOOG,1962) suplementado com 0,4 M sacarose, 30% (v/v) glicerol, 15% (v/v) DMSO,15% (v/v) etilenoglicol e o pH foi ajustado para 5,7 ± 0,1; T4 – PVS3 composta por meio MS, 2 M de glicerol e 0,4 M de sacarose. Para cada tratamento, 10 mg de sementes foram colocadas em criotubos contendo 2 mL de uma das diferentes soluções.

Os criotubos com os tratamentos foram armazenados em NL sob temperatura de -196 °C durante um mês. Após a retirada das sementes do NL, a recuperação ocorreu por descongelamento em banho-maria sob temperatura de 40 °C durante 1,5 minutos. As soluções de criopreservação foram removidas dos criotubos e as sementes lavadas com água destilada autoclavada em câmara de fluxo laminar. As sementes foram submetidas ao teste de tetrazólio para avaliar a viabilidade do embrião após o congelamento nas diferentes soluções vitrificantes.

132

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 10 repetições por tratamento. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância.

### **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A criopreservação surge como alternativa para o armazenamento de material biológico a longo prazo, sendo um método simples e eficiente, quando comparado aos métodos tradicionais de conservação, mantendo a estabilidade genética e a viabilidade do material por longos períodos, evitando assim a deterioração do material, como acontece nos métodos tradicionais (SANTOS, 2001; VENDRAME et al., 2014).

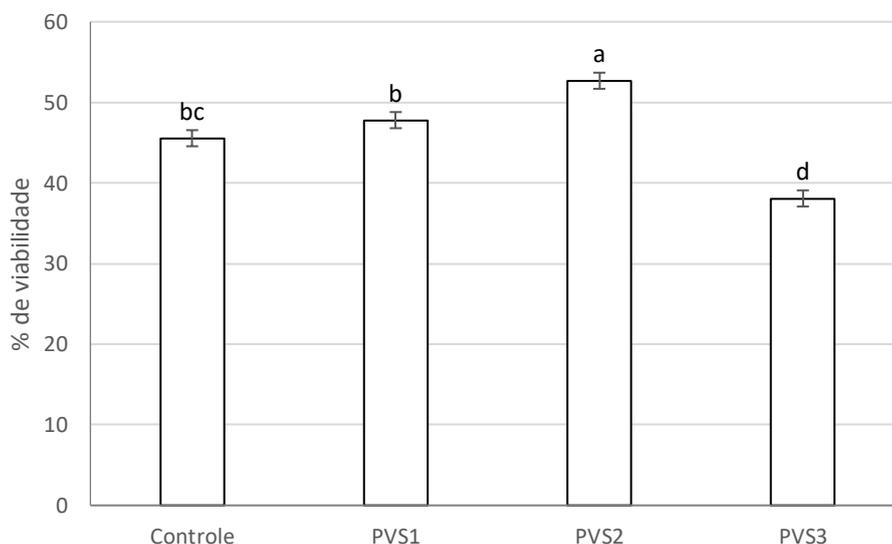
As sementes de orquídeas podem ser consideradas ortodoxas, devido ao seu comportamento fisiológico durante o armazenamento, tolerando ambientes de armazenamento com baixas temperaturas mesmo após serem desidratadas a níveis

baixos (5 a 7% de umidade), mantendo a viabilidade do material (ALVAREZ-PARDO; FERREIRA, 2006; FERRARI, 2016).

As sementes de *Cattleya forbesii* e *Cattleya walkeriana*, apresentavam 46,23% e 55,77% de sementes viáveis antes do procedimento de criopreservação. As sementes ao serem observadas através de lupa estereoscópica detinham embriões presentes e não apresentaram más formações e sua viabilidade foi comprovada através de teste de tetrazólio.

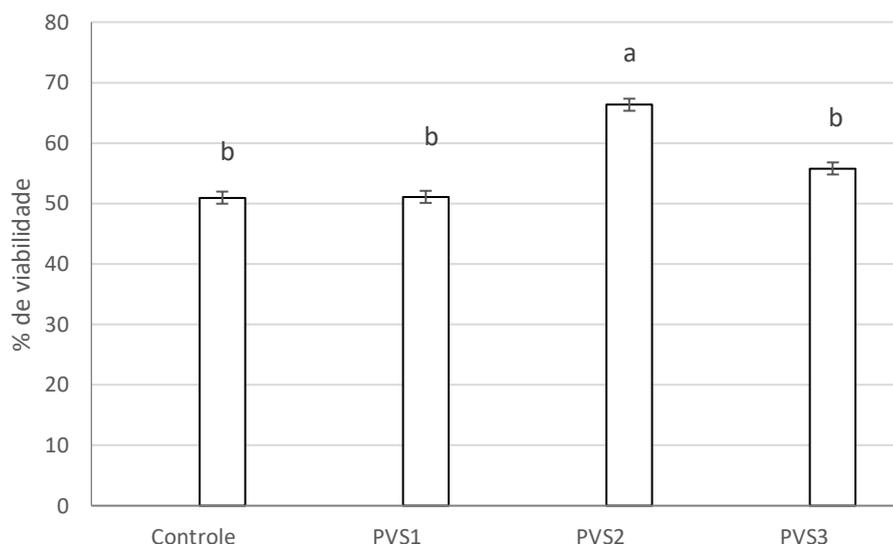
Para as sementes de *C. forbesii* foram obtidos os seguintes resultados no teste de tetrazólio após a retirada do NL: T1 – sem solução crioprotetora 45,55% de viabilidade; T2 – PVS1 47,79%; T3 – PVS2 52,68%; T4 – PVS3 38,08% (Figura 1).

**Figura 1** - Média das porcentagens de viabilidade das sementes da orquídea *Cattleya forbesii* obtidas através de teste de tetrazólio 1% após serem tratadas com diferentes soluções vitrificantes e imersas em nitrogênio líquido- NL. Valores representam médias de 10 contagens independentes. Médias na coluna seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (P=0,05).



Para as sementes de *C. walkeriana* foram obtidos os seguintes resultados no teste de tetrazólio após a retirada do NL: T1 – sem solução crioprotetora 50,96% de viabilidade; T2 – PVS1 51,09%; T3 – PVS2 66,33%; T4 – PVS3 55,79% (Figura 2).

**Figura 2** - Média das porcentagens de viabilidade das sementes da orquídea *Cattleya walkeriana* obtidas através de teste de tetrazólio 1% após serem tratadas com diferentes soluções vitrificantes e imersas em nitrogênio líquido- NL. Valores representam médias de 10 contagens independentes. Médias na coluna seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (P=0,05).



Para as duas espécies (*C. forbesii* e *C. walkeriana*) a solução PVS2 mostrou melhor viabilidade após a retirada das sementes do NL (52,68% e 66,33%), superando a viabilidade inicial em 6,45% a mais para a *C. forbesii* e 10,56% para *C. walkeriana*, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos, demonstrando assim que a solução nessas duas espécies auxiliou a quebra de dormência das sementes. A solução PVS2 é altamente concentrada, evitando a formação de cristais de gelo, durante o congelamento e descongelamento das sementes (SAKAI et al., 1990).

Para os demais tratamentos em ambas espécies, PVS1 e PVS3 não apresentaram diferença estatística em relação ao tratamento controle, que não utilizou nenhuma substância para proteger as sementes durante o congelamento.

Para Souza (2015) a criopreservação não apresentou diferença estatística entre tratamentos sem solução crioprotetora e PVS2, mas foram superiores quando foi adicionado fluoroglucinol ao PVS2, que é outra substância que confere crioproteção ao material. O autor relaciona o teor de água presente nas sementes como fator de sobrevivência, pois quanto menos água no interior das células, menos cristais de gelo serão formados, e assim menor risco dos cristais danificarem as

membranas, e a célula morrer por extravasar o conteúdo celular (SANTOS, 2001; CARVALHO, 2006).

Heringer (2013) criopreservou e regenerou explantes de pupunha após submeter os explantes ao tratamento com solução PVS3, que contem glicerol e sacarose na composição, atuando na preservação das estruturas celulares, alterando as condições osmóticas intra e extracelulares. A sacarose e outros carboidratos atuam apenas na parede celular, e afetam o processo de vitrificação extracelular, evitando assim efeitos tóxicos, como pode ocorrer com as soluções que contém DMSO e glicerol que atuam no espaço intracelular, como para o caso de pupunha que se mostrou tóxico. O glicerol, presente na solução de PVS3, é um crioprotetor penetrante que reduz a quantidade de gelo formada e se comporta como um agente anticongelante, baixando a concentração de água e sais extracelulares, que são perdidos por causa da osmose (MUBBARAKH et al., 2013).

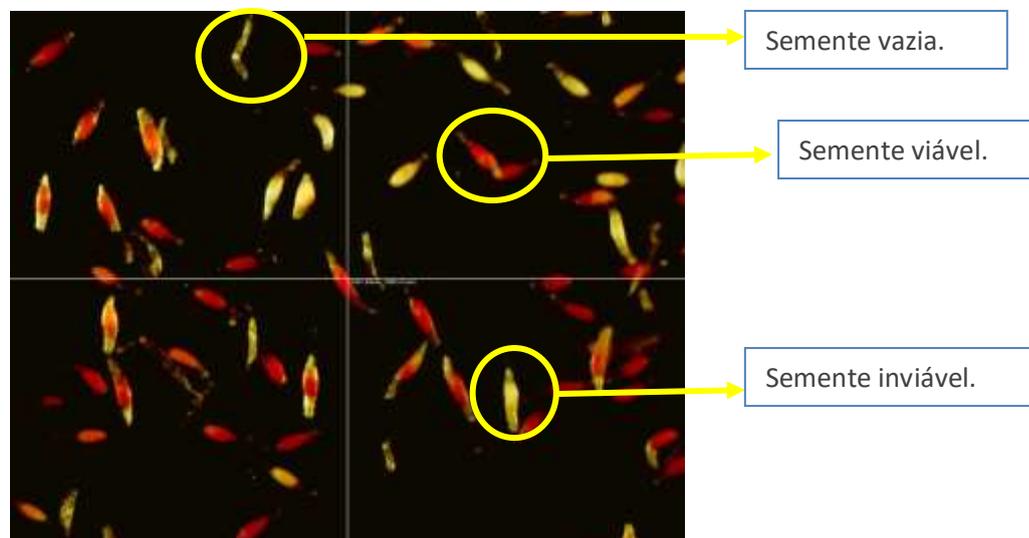
A escolha da solução crioprotetora deve ser feita baseada no material a ser criopreservado, pois as soluções DMSO e glicerol penetram no espaço intracelular, e sacarose e outros carboidratos não penetram na célula, e afetam os processos de criopreservação em diferentes compartimentos do tecido celular, protegendo contra as injúrias do congelamento (Heringer, 2013).

Mubbarakh et al., (2013) criopreservou protocormos de orquídea com sucesso ao utilizar PVS3 como crioprotetor, ao verificar membranas e paredes celulares intactas após o descongelamento, e a regeneração dos tecidos no cultivo *in vitro*.

Alvarez-Pardo e Ferreira (2006) relataram a perda total da viabilidade de sementes de diversas espécies de orquídeas conforme aumentou o período de armazenamento em temperaturas entre 5 °C e -18 °C, de maneira contrária ao que acontece na criopreservação, e assim estabelecer protocolos de criopreservação para cada espécie de orquídea é importante para a preservação das espécies.

Para ser considerado um processo viável, a criopreservação deve fornecer material biológico vivo e geneticamente estável após a retirada do NL (SANTOS, 2000). A sobrevivência do material após o tratamento com as soluções crioprotetoras permitiu reduzir a quantidade de água nas células e evitar os danos físicos que os cristais de gelo podem causar, assim a utilização de soluções osmoprotetoras presentes na solução de PVS2 demonstrou que é possível a recuperação dos tecidos sem injúria celular (Figura 3).

**Figura 3** - Imagem em lupa estereoscópica das sementes de *C. forbesii* submetidas ao tratamento com PVS2 após teste de tetrazólio



A presença de DMSO na solução de PVS1 e PVS2, é relatada por Suzuki et al. (2015) como sendo também o melhor resultado na criopreservação de outra espécie da família Orchidaceae, pois o DMSO por meio de difusão age mutuamente com as membranas celulares, funcionando com um anticongelante, preservando a membrana dos cristais de gelo e repelindo processos metabólicos nocivos no descongelamento (VENDRAME et al., 2014).

136

O etilenoglicol presente na solução de PVS1 e PVS2 tem função semelhante ao DMSO no processo de criopreservação, protegendo estruturas celulares ao penetrar rapidamente na célula, mantendo a integridade celular, promovendo a máxima integridade genética e biológica (SUZUKI et al., 2015).

A diferença entre as soluções de PVS1 e PVS2, além das concentrações do glicerol, etilenoglicol e DMSO, são a presença na solução de sorbitol para PVS1 e sacarose para PVS2.

Para Ferrari (2016) o teor de umidade da semente foi o fator determinante para o sucesso da criopreservação, onde sementes com menor teor de umidade obtiveram maior taxa de germinação após o congelamento em NL, e sementes de orquídeas com cerca de 30% de umidade, não sobreviveram ao congelamento. Esse teor de umidade pode influenciar na atuação das soluções crioprotetoras

O processo de regeneração evidencia a viabilidade do material criopreservado, mas apenas o teste de tetrazólio segundo Santos (2000) não é suficiente para atestar a viabilidade do material criopreservado, pois as células após o descongelamento estão em estado de choque e podem ou não sofrer reação a coloração dos sais, sendo o estabelecimento de uma nova planta o método mais confiável de atestar a viabilidade do processo.

Os custos de manutenção do material criopreservado são relativamente baixos, após os custos iniciais de implantação e de reagentes (R\$ 3.000), cada criotubo com a solução de PVS2 será em média de R\$ 0,57, num tambor de criopreservação de 47 litros, onde é possível acondicionar 750 criotubos, mais o NL que deve ser repostado mensalmente, sendo um dos custos fixos da manutenção com custo médio de R\$ 100.

De acordo com Carvalho (2006) o estabelecimento de bancos de germoplasma baseados na criopreservação, possuem um custo muito menor quando comparado aos outros métodos de conservação, e podem permitir a conservação de grande variabilidade genética, sendo uma forma segura de armazenamento.

137

#### **4 CONCLUSÃO**

As soluções vitrificantes denominadas PVS demonstraram capacidade de manter ou até aumentar a viabilidade das sementes de *C. forbesii* e *C. walkeriana*, sendo a solução PVS2 capaz de quebrar a dormência das sementes das duas espécies.

O uso das soluções PVS1 e PVS3 mantiveram a viabilidade inicial das duas espécies estudadas, embora não tenham diferido das sementes que não utilizaram nenhuma solução crioprotetora, e desta forma podem ser utilizadas em protocolos de criopreservação para as duas espécies estudadas.

#### **REFERÊNCIAS**

ALVAREZ-PARDO, V.; FERREIRA, A. G. Armazenamento de Sementes de Orquídeas. **Revista Brasileira de Sementes**, [s.l.], v. 2, n. 28, p.92-98, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: Mapa/ACS, 2009. p.307-324.

CARVALHO, V. S. **Criopreservação de Sementes e Pólen de Orquídeas**. 2006. 69 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa- UFV, Viçosa- MG, 2006. Disponível em: <[http://www.locus.ufv.br/bitstream/handle/123456789/1079/texto\\_completo.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://www.locus.ufv.br/bitstream/handle/123456789/1079/texto_completo.pdf?sequence=1&isAllowed=y)>. Acesso em: 29 maio 2016.

FERRARI, E. A. P. **Criopreservação de Sementes de Orquídeas Brasileiras**. 2016. 71 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

HERINGER, A. S. **Embriogênese Somática e Criopreservação de Embriões Somáticos em Pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth)**. 2013. 128 f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Área de concentração Recursos Genéticos Vegetais) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013. Disponível em: <<https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/107140/317844.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 19 jun. 2016.

JOLY, A. B. **Botânica: Introdução à Taxonomia Vegetal**. 12. ed. São Paulo: Nacional, 1998. 777 p.

LORENZI, H.; SOUZA, H.M. **Plantas Ornamentais do Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras**. 3.ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2001. 1120p.

138

MARTINELLI, G.; MORAES, M.A. **Livro vermelho da flora do Brasil**. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson, 2013. 1100p.

MUBBARAKH, S. A. et al. Cryopreservation of Brassidium Shooting Star Orchid Using the PVS3 Method Supported with Preliminary Histological Analysis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [s.l.], v. 172, n. 2, p.1131-1145, out. 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24146369>>. Acesso em: 19 jun. 2016.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473–497, 1962.

SANTOS, I. R. I. Criopreservação: potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, 7., 1999, Brasília - DF. **Palestra...** Brasília - DF: R. Bras. Fisiol. Veg., 2000. v. 12, p. 70 - 84.

\_\_\_\_\_. Criopreservação de germoplasma vegetal. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, [s.l.], n. 20, p.60-65, maio 2001. Disponível em: <[http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio20/20\\_13.pdf](http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio20/20_13.pdf)>. Acesso em: 15 fev. 2016.

SAKAI, A.; KOBAYASHI, S.; OIYAMA, I. Cryopreservation of nuclear cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. **Plant Cell Report**. v.9, p. 30–33, 1990.

SOUZA, G. R. B. de. **Desenvolvimento *in vitro* e Criopreservação de Sementes de Orquídeas**. 2015. 53 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista- Unesp, Jaboticabal, 2015.

SUZUKI, A. B. P. et al. Criopreservação de Sementes de Orquídea *Arundina bambusifolia*. In: SIMPOSIO BRASILEIRO SOBRE CULTIVO DE ORQUIDEA, 2., 2015, Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal: Unesp, 2015. p. 31 - 35.

TAKANE, R. J.; YANAGISAWA, S. S.; PIVETTA, K. F. L. **Cultivo moderno de orquídeas: cattleya e seus híbridos**. Fortaleza: UFC. 2010, 179p.

VENDRAME, W. A. et al. Orchid cryopreservation. **Ciência e Agrotecnologia**, v.38, n.3, p.213-229, 2014.