RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 05/03/2022.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

GERMINAÇÃO DE SEMENTES E CONSERVAÇÃO DE ORQUÍDEAS NATIVAS DAS AMÉRICAS

Suzana Targanski Sajovic Pereira

Engenheira Agrônoma

2020

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

GERMINAÇÃO DE SEMENTES E CONSERVAÇÃO DE ORQUÍDEAS NATIVAS DAS AMÉRICAS

Suzana Targanski Sajovic Pereira

Orientadora: Profa. Dra. Kathia Fernandes Lopes Pivetta

Coorientador: Prof. PhD Wagner Aparecido Vendrame

Coorientador: Prof. Dr. José Carlos Sorgato

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Agronomia (Produção Vegetal)

2020

P436g

Pereira, Suzana Targanski Sajovic
Germinação de sementes e conservação de orquideas nativas das Américas / Suzana Targanski Sajovic Pereira. -- Jaboticabal, 2020
48 p. : il., tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientadora: Kathia Fernandes Lopes Pivetta
Coorientador: Wagner Aparecido Vendrame

1. Criopreservação. 2. Fontes de luz. 3. Plantas Meios de cultivo. 4. Propagação. 5. Técnicas in vitro. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: GERMINAÇÃO DE SEMENTES E CONSERVAÇÃO DE ORQUÍDEAS NATIVAS DAS AMÉRICAS

AUTORA: SUZANA TARGANSKI SAJOVIC PEREIRA
ORIENTADORA: KATHIA FERNANDES LOPES PIVETTA
COORIENTADOR: WAGNER APARECIDO VENDRAME
COORIENTADOR: JOSÉ CARLOS SORGATO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em AGRONOMIA (PRODUÇÃO VEGETAL), pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. KATHIA FERNANDES LOPES PIVETTA
Departamento de Produção Vegetal (Horticultura) / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Prof. Dr. PAULO HERCÍLIO VIEGAS RODRIGUES
Departamento de Produção Vegetal-ESALQ/USP / Piracicaba/SP

Profa. Dra. RENATA APARECIDA DE ANDRADE
Departamento de Produção Vegetal (Horticultura) / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Pesquisador Dr. GILBERTO ROSTIROLLA BATISTA DE SOUZA
Ginegar Polysack Brasil / São Carlos/SP

Prof. Dr. RICARDO TADEU DE FARIA
Departamento de Agronomia da UEL / Londrina/PR

Jaboticabal, 05 de março de 2020

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

SUZANA TARGANSKI SAJOVIC PEREIRA – Nascida em 05 de fevereiro de 1988, na cidade de Amambai-MS, filha de Eva Rosalia Targanski e Erval Sajovic Pereira. Graduada em Engenharia Agronômica em 05 de março de 2015 pela Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), Faculdade de Ciências Agrárias (FCA), Dourados-MS. Na graduação foi bolsista de Iniciação Cientifica pela CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), realizando projetos na área de Ciências do Solo e Floricultura sob orientação das professoras Dra. Elaine Reis Pinheiro Lourente, Dra. Paula Pinheiro Padovese Peixoto e Dra. Yara Brito Chaim Jardim Rosa. Realizou graduação sanduíche na Universidad Austral de Chile (UACH), Câmpus de Isla Teja – Valdivia, pelo Programa MARCA-Mercosul como bolsista CAPES. Mestre em Agronomia (Produção Vegetal) em 26 de julho de 2016, pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (UNESP), Campus de Jaboticabal-SP, sob orientação da Profa. Dra. Kathia Fernandes Lopes Pivetta. Ingressou no Doutorado pelo Programa de Pós-graduação em Agronomia (Produção Vegetal) – em 03 de agosto de 2016, pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (UNESP), Campus de Jaboticabal-SP, sendo bolsista da CAPES, tendo como orientadora a Profa. Dra. Kathia Fernandes Lopes Pivetta e coorientadores os Professores PhD. Wagner A. Vendrame e Dr. José Carlos Sorgato. Realizou Doutorado Sanduíche na University of Florida (UF/IFAS) no Tropical and Education Center (TREC) sob supervisão do Professor PhD. Wagner Aparecido Vendrame.

À Deus, por ser meu refúgio e minha fortaleza.

Aos meus pais Eva Rosalia Targanski e Erval Sajovic Pereira pela dedicação, amor incondicional e sacrifícios durante minha vida, as minhas avós Zélia Sajovic Pereira e Maria Targanski pelos ensinamentos e carinho, aos meus irmãos Evandro, Gabriela e Herval por todo carinho e incentivo oferecidos, e aos meus amados sobrinhos Arthur, Heitor, Davi, Guilherme e Henrique por serem esperança e alegria.

Ao Fernando pelo cuidado, amor e carinho.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal – FCAV/UNESP, pelos ensinamentos oferecidos.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão de bolsa de estudos de doutorado e de bolsa Sanduíche.

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

À Professora Dra. Kathia Fernandes Lopes Pivetta, pela orientação, pela oportunidade de aprender, crescer e trabalhar com o que gosto, por apresentar de forma fascinante o universo da floricultura e paisagismo, pela amizade, pelos ensinamentos acadêmicos e de vida, e pela paciência dispensada ao longo dessa jornada, fundamentais para meu crescimento como profissional, pesquisadora, docente e principalmente como ser humano.

Aos meus pais Eva Rosalia Targanski e Erval Sajovic Pereira pelo carinho, paciência, apoio à minhas decisões, exemplo de vida, conversas, ensinamentos e infinito amor.

Ao Professor Dr. Wagner Aparecido Vendrame, pela oportunidade e receptividade em seu laboratório, pela coorientação, e por estar sempre disposto a esclarecer minhas dúvidas.

Ao Professor Dr. José Carlos Sorgato, pela coorientação, por me permitir voltar à UFGD, pelo aprendizado e ensinamentos.

Aos docentes do curso de Pós-Graduação em Produção Vegetal da FCAV/Unesp pela importante contribuição acadêmica.

Ao Prof. Dr. Ricardo Tadeu Faria da Universidade Estadual de Londrina-UEL e aos seus orientados Douglas Bertoncelli, Gianne Stulzer e Jean Baudraz pelo aprendizado e receptividade.

Ao Prof. Dr. Sérgio Valiengo Valeri docente da FCAV/Unesp pelos ensinamentos, oportunidade de fazer estágio docência e colega nas aulas de Yoga.

Aos membros da Comissão do Exame Geral de Qualificação Dr. Marcos Vieira Ferraz o e Profa. Dra. Renata Aparecida de Andrade, e aos membros da Banca Examinadora Prof. Dr. Paulo Hercílio Viegas Rodrigues, Prof. Dr. Ricardo Tadeu Faria, Profa. Dra. Renata Aparecida de Andrade e Dr. Gilberto Rostirolla

Batista de Souza, pelas valiosas contribuições para a melhoria do artigo científico e da Tese.

Aos técnicos de laboratório Jackeline Schultz Soares (UFGD) e David Beleski (UF/IFAS, TREC), pela ajuda, por tirar dúvidas, pelas risadas e amizade. Aos membros da Comissão do Exame Geral de Qualificação o Dr. Marcos Vieira Ferraz a Profa. Dra. Renata Aparecida de Andrade.

Aos funcionários do Departamento de Produção Vegetal e do Viveiro Experimental de Plantas Ornamentais e florestais da Unesp de Jaboticabal: Rosane Betioli, Wagner Tarina, Adevair Pugliano e Roberto Carlos Costa pelo apoio, ensinamentos e amizade.

Aos colegas do Grupo de Estudos e Pesquisa em Paisagismo e Floricultura -GEPFlor, Gilberto Rostirolla, Renata Gimenes, Carla Costa, Marina Nogueira, Amanda Bezerra, Lívia Praseres, Cibele Mantovani, Ana Carolina Muniz, Águila Santos, Guilherme Vieira, Giovanna Meira, Milena Souza e Larissa Trinque pela troca de ensinamentos, parceria tanto em laboratório quanto em visitas técnicas e principalmente pelo convívio, pois esse me tornou alguém melhor.

Aos amigos Tatiane Jeromini, Jordana Florês e Ricardo Fachinelli por todo apoio, pelo amparo nos momentos difíceis, pelos momentos de alegria, e principalmente pela amizade, serei eternamente grata.

À Maria do Carmo Carvalho (Nina) pelo convivo, cuidado e amizade ao longo de todo o período de pós-graduação.

À Marli da Guia Pelizaro Valeri, minha instrutora de Yoga por ter me acolhido, ajudado a aprender a respirar, acalmar, refletir e pelas conversas.

Ao Fernando Rodrigues e sua família pelo carinho e acolhimento.

Por fim, a todos aqueles que fizeram parte na minha trajetória acadêmica e depositaram uma enorme confiança em mim e que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

Página

RESUMO..... iii
ABSTRACT..... iv
CAPÍTULO 1 - Considerações gerais..... 1
1.1 Introdução..... 1
1.2 Revisão De Literatura..... 2
1.2.1 A família Orchidaceae..... 2
1.2.2 Os gêneros de orquídeas: *Brassavola*, *Encyclia* e *Epidendrum*..... 3
1.2.3 Características das sementes de orquídeas e o desenvolvimento dos protocormos..... 5
1.2.4 Fontes de luz na semeadura e no desenvolvimento *in vitro*..... 6
1.2.5 Formulações de meio de cultivo..... 8
1.2.6 Criopreservação de sementes de orquídeas…..…..…..…... 9
1.3 Referências..... 11
CAPÍTULO 2 - Lâmpada fluorescente ou LEDs, e qual formulações de meio de cultivo utilizar na germinação e no desenvolvimento inicial *in vitro* de *Brassavola perrini*?..... 18
Resumo..... 18
2.1 Introdução..... 18
2.2 Material E Métodos 20
2.3 Resultados 22
2.4 Discussão 25
2.5 Conclusões 28
2.6 Referências 29
CAPÍTULO 3 - Eficiência de crioprotetores na criopreservação de duas espécies de orquídeas das Américas..... 32
Resumo..... 33
3.1 Introdução..... 33
3.2 Material E Métodos..... 35
3.3 Resultados..... 38
3.4 Discussão 41

3.5 Conclusões 45
3.6 Referências 45

GERMINAÇÃO DE SEMENTES E CONSERVAÇÃO DE ORQUÍDEAS NATIVAS DAS AMÉRICAS

RESUMO – A propagação *in vitro* e conservação *ex situ*, são técnicas, que podem ser aprimoradas através da escolha adequada da fonte luminosa, das formulações do meio de cultivo e de crioprotetores. O presente estudo teve por objetivos: (i) estudar fontes de luz a partir de lâmpadas fluorescentes e diodos emissores de luz (LEDs) e formulações de meio de cultivo na germinação e no desenvolvimento inicial da espécie de orquídea *Brassavola perrinii* e (ii) avaliar a eficiência da solução vitrificante (PVS2) combinada ao floroglucinol 1% em nitrogênio líquido para a criopreservação de sementes maduras das espécies *Encyclia cordigera* e *Epidendrum ciliare*. Os experimentos foram instalados em delineamento inteiramente casualizado e ambos foram duplicados. No primeiro os tratamentos foram arranjados em esquema fatorial 5x4 com cinco condições de luz: LF - lâmpada fluorescente; LB - LED branco; LA - LED azul; LV- LED vermelho e LAV – LED azul (50%) e vermelho (50%) e quatro formulações de meio de cultivo (MS, ½MS, VW e K), com quatro repetições e média de 125 sementes por parcela. Aos 90 dias após a semeadura foram avaliadas a porcentagem de germinação, de protocormos clorofilados e o desenvolvimento dos protocormos através das classes: P1, P2, P3 e P4 para cálculo do índice de desenvolvimento protocormos. No segundo experimento foram oito tratamentos: 1) germinação *in vitro* direta; 2) imersão direta em nitrogênio líquido, sem crioprotetores; 3) PVS2 por 60 min; 4) PVS2 por 120 min; 5) PVS2 por 180 min; 6) PVS2 + floroglucinol1% por 60 min; 7) PVS2 + floroglucinol1% por 120 min; 8) PVS2 + floroglucinol1% por 180 min, com cinco repetições e média de 120 sementes por parcela. Imersão em nitrogênio líquido, à temperatura de -196 °C por 72 horas. Foram avaliadas a viabilidade e a porcentagem de germinação das sementes, antes e após a aplicação dos tratamentos. Aos 45 dias após a recuperação da criopreservação foi avaliado o desenvolvimento dos protocormos através das classes morfológicas P1, P2 e P3. Os dados foram submetidos à análise de variância e aqueles com valor percentual foram previamente transformados em arco-seno $(x/100)^{1/2}$. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey $p<0,05$. Para *B. perrinii*, concluiu-se que o percentual de germinação não foi influenciado pelos espectros de luz, mas foi maior nas formulações ½ MS e VW. O maior índice de desenvolvimento dos protocormos de *B. perrinii* foi observado quando submetidos ao espectro de luz da fonte de iluminação com lâmpadas fluorescentes em meio de cultivo Vacin e Went. A utilização da solução vitrificante (PVS2) combinado ao floroglucinol 1% foi eficiente na recuperação de sementes criopreservadas em nitrogênio líquido, elevou a porcentagem de germinação e desenvolvimento dos protocormos para as duas espécies em estudo. Os resultados observados indicam o uso de PVS2 combinado com floroglucinol 1% por 60 min para a criopreservação de sementes de *E. cordigera*, e PVS2 com floroglucinol 1% por 180 min para sementes de *E. ciliare*. O presente estudo também indica que a resposta à criopreservação após o armazenamento à frio é específica da espécie e requer ajustes no tempo de exposição ao PVS2 a 0 °C antes da imersão em nitrogênio líquido.

Palavras-chave: criopreservação, fontes de luz, meio de cultivo, protocormo, semeio *in vitro*, solução pré-vitrificante

SEED GERMINATION AND CONSERVATION OF NATIVE ORCHIDS FROM AMERICAS

ABSTRACT – *In vitro* propagation and *ex situ* conservation, are techniques that can be improved through the appropriate choice of light source, formulations of the culture medium and cryoprotectants. The aims this work was: (i) study the effect of light sources from fluorescent lamps and light-emitting diodes (LEDs) and cultivation medium formulations on the germination and initial development of *Brassavola perrinii* orchid and (ii) evaluate the efficiency of the vitrify solution (PVS2) combined with phloroglucinol 1% in liquid nitrogen for the cryopreservation of mature seeds of the species *Encyclia cordigera* and *Epidendrum ciliare*. The experiments were installed in a completely randomized design and both were duplicated. In the first, the treatments were arranged in a 5x4 factorial scheme with five light conditions: LF - fluorescent lamp; LB - white LED; LA - blue LED; LV- Red LED and LAV - Blue LED (50%) and red (50%), and four cultivation medium formulations (MS, ½MS, VW and K), with four replications and an average of 125 seeds per plot. At 90 days after sowing, the percentage of germination, of chlorophyll protocorms and the development of protocorms through the classes: P1, P2, P3 and P4 to calculate the protocorms development index. In the second experiment, there were eight treatments: 1) direct in vitro germination; 2) direct immersion in liquid nitrogen, without cryoprotectants; 3) PVS2 for 60 min; 4) PVS2 for 120 min; 5) PVS2 for 180 min; 6) PVS2 + floroglucinol1% for 60 min; 7) PVS2 + floroglucinol1% for 120 min; 8) PVS2 + floroglucinol1% for 180 min, respectively), with five repetitions and an average of 120 seeds per plot. Immersion in liquid nitrogen, at a temperature of -196 °C for 72 hours. Viability was evaluated using the tetrazolium test, and the germination percentage of the seeds, before and after the application of the treatments. 45 days after the recovery of cryopreservation, the development of the protocorms was evaluated through the morphological classes P1, P2 and P3. The data were submitted to analysis of variance and those with percentage values were previously transformed into arc sine $(x/100)^{1/2}$. The means were compared using the Tukey test $p<0,05$. For *B. perrinii,* he concluded that the germination percentage was not influenced by the light spectra but was higher in the ½ MS and VW formulations. The highest rate of development of *B. perrinii* protocormos was observed when using the light spectrum of the light source with fluorescent lamps in the Vacin and Went culture medium. The use of the vitrify solution (PVS2) combined with phloroglucinol 1% was efficient in the recovery of cryopreserved seeds in liquid nitrogen, increasing the percentage of germination and development of protocorms for the two species under study. The observed results indicate the use of PVS2 combined with 1% floroglucinol for 60 min for the cryopreservation *of E. cordigera* seeds, and PVS2 with 1% phloroglucinol for 180 min for *E. ciliare* seeds. The present study also indicates that the response to cryopreservation after cold storage is species-specific and requires adjustments in the time of exposure to PVS2 at 0 ° C before immersion in liquid nitrogen.

Keywords: cryopreservation, light sources, culture medium, protocorm, *in vitro* sowing, pre-vitrification solution

CAPÍTULO 1 - Considerações gerais

1.1 Introdução

A família Orchidaceae é a segunda maior família de plantas com flores (Chase et al., 2015). No entanto, em decorrência da frequente destruição de seus habitats naturais, somado ao comércio e exploração ilegal, e devido às suas características ornamentais, muitas espécies de orquídeas estão desaparecendo da natureza em níveis preocupantes, levando inúmeras espécies à extinção (Galdiano Júnior et al., 2012; Hosomi et al., 2012).

As sementes de orquídeas contêm embrião rudimentar com poucas reservas (Arditti, 1992), são desprovidas de cotilédones e apresentam endosperma extremamente reduzido, essas características comprometem a nutrição do embrião durante o processo germinativo (Ferreira et al., 2010). Na natureza essas sementes dependem exclusivamente de associação com fungos micorrízicos específicos para completar seu desenvolvimento (Agustini et al., 2009).

Para contornar essa problemática pode ser realizada a semeadura assimbiótica *in vitro*, que de acordo com Martini et al. (2001), é uma técnica relevante do ponto de vista comercial e ecológico. As plantas produzidas dessa forma podem ser utilizadas em programas de reintrodução de espécies nativas em áreas de preservação ambiental devido à variabilidade genética gerada (Schneiders et al., 2012). Portanto, a criação de protocolos de propagação específicos para cada espécie é importante para suprir a demanda pelo consumo crescente, evitando assim a coleta ilegal.

Fatores exógenos e endógenos influenciam no processo germinativo de sementes de orquídeas. Os que podem ser controlados, ou seja, os exógenos, englobam a composição do meio nutritivo, luz e temperatura (Yeung et al., 2018). O sucesso na tecnologia e aplicação dos métodos de multiplicação *in vitro* deve-se à melhor compreensão dos requerimentos nutricionais das células e dos tecidos em cultura (Schneiders et al., 2012).

Segundo Kauth et al. (2008), para a germinação das sementes de orquídeas epífitas é necessário a presença de luz, enquanto as espécies terrícolas de escuro, embora essas respostas sejam muitas vezes determinadas pela espécie,

independentemente do seu hábito de crescimento. Contudo, são poucos os estudos relacionados aos efeitos que os diferentes espectros de luz têm sobre a germinação de sementes e o desenvolvimento dos protocormos de orquídeas epífitas.

É crescente a necessidade mundial por variabilidade genética para os programas contínuos de melhoramento, assim como, há riscos de erosão genética causada pelo próprio melhoramento, tornando imperativa a conservação de espécies e manutenção de bancos de germoplasma (Carneiro, 2014).

A criopreservação representa um dos pilares da conservação *ex situ* da biodiversidade, assim, com a utilização dessa técnica podem ser criados bancos de sementes (Seaton et al., 2010; Merritt et al., 2014; Popova et al., 2016). O método consiste na conservação de material vegetal por longos períodos em temperaturas ultrabaixas (Vendrame et al., 2014). A utilização dessa técnica para a conservação de sementes de orquídeas é uma das ferramentas que pode ser utilizada na criação desses bancos de germoplasma, tornando disponível o material para o melhoramento genético de orquídeas, que é baseado principalmente no desenvolvimento de híbridos (Arditti, 1984; Carneiro, 2014).

A elucidação dos protocolos adequados para obtenção do meio de cultivo ideal, estudo da luz e conservação das diferentes espécies de orquídeas é relevante, pois, técnicas direcionadas auxiliam na otimização dos sistemas de propagação *in vitro* e de conservação *ex situ*, favorecendo os meios acadêmico, comercial e ecológico.

Assim, o presente estudo teve como principais objetivos estudar fontes de luz a partir de lâmpadas fluorescentes e diodos emissores de luz (LEDs) e formulações de meio de cultivo na germinação e no desenvolvimento inicial da espécie de orquídea *Brassavola perrinii* e avaliar a eficiência da solução vitrificante (PVS2) combinada ao floroglucinol 1% em nitrogênio líquido para a criopreservação de sementes maduras das espécies *Encyclia cordigerae* e *Epidendrum ciliare*.

3.5 Conclusão

A utilização da solução vitrificante (PVS2) combinado ao floroglucinol 1% foi eficiente na recuperação de sementes criopreservadas em nitrogênio líquido, elevou a porcentagem de germinação e desenvolvimento dos protocormos para as duas espécies em estudo. Os resultados observados indicam o uso de PVS2 combinado com floroglucinol 1% por 60 min para a criopreservação de sementes de *Encyclia cordigera*, e PVS2 com floroglucinol 1% por 180 min para sementes de *Epidendrum ciliare*. O presente estudo também indica que a resposta à criopreservação após o armazenamento à frio é específica da espécie e requer ajustes no tempo de exposição
ao PVS2 a 0 °C antes da imersão em nitrogênio líquido.

3.6 Referências

Alvarez-Pardo V, Ferreira AG (2006) Armazenamento de sementes de orquídeas. **Revista Brasileira de Sementes** 28:92-98.

Arditti J, Ghani AKA (2000) Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. **New Phytologist, Lancaster** 145:367-421.

Barbosa JC, Maldonado Júnior JRW (2015) **AgroEstat: sistema para análises estatísticas de ensaios agronômicos.** Versão 1.1.0.711. Jaboticabal: Funep, 396 p.

Benson EE, Bremmer D (2004) Oxidative stress in the frozen plant: a free radical point of view. In: Fuller, B.J.: N. Lane; and E.E. Benson (eds.). **Life in the Frozen State**. Boca Raton: CRC Press, p. 205-24.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2009) **Regras para análise de sementes**. Brasília: MAPA, 399p.

Cerna M, Valdivieso P, Cella R, Mátyás B, Aucapiña C (2018) Cryopreservation of orchid seeds through rapid and step freezing methods. **F1000Research** 7:209.

Galdiano Júnior RF, Lemos EGM, Faria RT, Vendrame WA (2012) Cryopreservation of *Dendrobium* hybrid seeds and protocorms as affected by phloroglucinol and Supercool X1000. **Scientia Horticulturae** 148: 154-160.

Galdiano Júnior RF, Lemos EGM, Vendrame WA (2013) Cryopreservation, early seedling development, and genetic stability of *Oncidium flexuosum* Sims. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 114:139-148.

Galdiano Júnior RF, Lemos EGM, Vendrame WA (2014) Seedling development and evaluation of genetic stability of cryopreserved *Dendrobium* hybrid mature seeds. **Applied Biochemistry and Biotechnology** 172:2521-2529.

Galdiano Júnior RF, Vendrame WA, Moretto C, Faria RT, Lemos EGM (2017) Seed cryopreservation, *in vitro* propagation and *ex vitro* growth of *Cattleya walkeriana* Gardner, a vulnerable ornamental orchid. **Australian Journal Crop Science** 11:485-490.

Hosomi ST, Custódio CC, Seaton PT, Marks TR, Machado-Neto NB (2012) Improved assessment of viability and germination of *Cattleya* (Orchidaceae) seeds following storage. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant** 48:127-136.

Hughes BA, Kane, ME (2018) Seed cryopreservation of selected Florida native orchid species. **Seed Science and Technology** 46:431-446.

Kang KA, Lee KH, Chae S, Zhang R, Jung MS, Ham YM, Baik JS, Lee NH, Hyun, JW (2006) Cytoprotective effect of phloroglucinol on oxidative stress induced cell damage via catalase activation. **Journal of cellular biochemistry** 97:609-620.

Kim MM, Kim SK (2010) Effect of phloroglucinol on oxidative stress and inflammation. **Food and Chemical Toxicology** 48:2925-2933.

Kulus D, Zalewska M (2014) Cryopreservation as a tool used in long-term storage of ornamental species–a review. **Scientia Horticulturae** 168:88-107.

Lavarack B, Harris W et al. (2002) **Botanica's Orchid.** San Diego: Laurel Glen Publishing, 568p.

Merritt DJ, Hay FR, Swarts ND, Sommerville KD, Dixon KW (2014) *Ex situ* conservation and cryopreservation of orchid germplasm**. International Journal of Plant Sciences** 175:46-58, 2014.

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum** 15:473-497.

Popova E, Kim HH, Saxena PK, Engelmann F, Pritchard HW (2016) Frozen beauty: The cryobiotechnology of orchid diversity. **Biotechnology advances** 34:380-403.

Reed BM (2008) **Plant cryopreservation: a practical guide**. New York: Springer, 513p.

Sakai A (1995) Cryopreservation of germplasm of woody plants. In: Bajaj Y.P.S. (ed.) **Cryopreservation of plant germplasm I. Biotechnology in agriculture and forestry**, v. 32. New York: Springer Verlag, p. 53-69.

Sakai A, Kobayashi S, Oiyama I (1990) Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. brasiliensis Tanaka) by vitrification. **Plant Cell Reports** 9:30-33.

Schofield E, Jones EP, Sarasan V (2018) Cryopreservation without vitrification suitable for large scale cryopreservation of orchid seeds. **Botanical Studies** 59:13.

Seaton PT, Hu H, Perner H, Pritchard HW (2010). *Ex situ* conservation of orchids in a warming world. **The botanical review** *76*:193-203.

Silva JAT, Dobránszki J, Ross S (2013) Phloroglucinol in plant tissue culture **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant** 49:1-16.

Suzuki ABP, Vidal TCM, Alves GAC, Junior DB, Biz G, Sorace M, Faria RT (2018) Cryopreservation of Brazilian orchid (*'Catasetum atratum*' Lindl.) seed at risk of extinction**. Australian Journal of Crop Science** 12:1051.

Suzuki RM, Moreira VC, Nakabashi M, Ferreira WDM (2009) *In vitro* germination and growth of *Hadrolaelia tenebrosa* (Rolfe) Chiron & VP Castro (Orchidaceae), an endangered species of the Brazilian flora. **Hoehnea** 36:657-666.

Swarts ND, Dixon KW (2009) Terrestrial orchid conservation in the age of extinction. **Annals of Botany** 104:543-556.

Thammasiri K, Soamkul l (2007) Cryopreservation of Vanda coerulea Griff. Ex Lindl. Seeds by vitrification. Sci Asia 33:223-227.

Vendrame WA (2018) Cryopreservation. In: Lee YI, Yeung ET (eds.). **Orchid Propagation: From Laboratories to Greenhouses-Methods and Protocols.** Springer Protocols Handbooks. New York: Humana Press, p. 282-302.

Vendrame WA, Faria RT (2011) Phloroglucinol enhances recovery and survival of cryopreserved *Dendrobium nobile* protocorms. **Scientia Horticulturae** 12:131-135.

Vendrame WA, Faria RT, Sorace M, Sahyun SA (2014) Orchid cryopreservation. **Ciência e Agrotecnologia** 38:213-229.

Vendrame WA, Khoddamzadeh AA (2017) Orchid biotechnology. **Horticultural Reviews** 44:173-228.

Zotz G (2013) The systematic distribution of vascular epiphytes a critical update. **Botanical Journal of the Linnean Society** 171:453-481.