

**Pemanfaatan Kriopreservasi untuk Penyimpanan Bibit Anggrek Jangka Panjang*****(Applications of Cryopreservation for Orchids Germplasm Long-term Storage)***

Arkan Setiaji\*, Rr Rifka Annisa  
BiOSC, Fakultas Biologi UGM Sleman, 55281  
\*Email korespondensi: arkan.setiaji@mail.ugm.ac.id

*(Article History: Received 05 Juni 2020; Revised 02 Agustus 2020; Accepted 7 Agustus 2020)*

**ABSTRAK**

Tanaman anggrek (Orchidaceae) telah menjadi komoditas penting di pasar perdagangan internasional karena keeksotisan dan daya tahan bunganya. Meskipun keragaman anggrek spesies menduduki peringkat kedua setelah Asteraceae dan hibridanya menduduki peringkat pertama, namun anggrek menghadapi ancaman kepunahan dan penurunan kualitas genetik. Program pemuliaan, seperti persilangan dan penyisipan gen unggul, serta perbanyakan in vitro perlu didukung dengan cara memastikan ketersediaan eksplan. Dalam rangka penyimpanan untuk kebutuhan jangka panjang, eksplan dapat disimpan menggunakan teknik kriopreservasi. Review ini bertujuan untuk memberikan gambaran umum terhadap kemajuan penelitian di bidang kriopreservasi, khususnya tanaman anggrek. Melalui program penyimpanan jangka panjang, gen-gen dan eksplan unggulan baik untuk pengembangan anggrek hibrida atau khususnya untuk tujuan konservasi anggrek langka bisa dipastikan ketersediaannya. Dalam artikel review ini telah dibahas berbagai riset tentang teknik kriopreservasi pada biji, protokorm, dan serbuk sari anggrek. Kemajuan pengembangan teknik telah dicapai, namun masih diperlukan banyak modifikasi agar suatu protokol kriopreservasi dapat diterapkan pada semua spesies dan hibrida anggrek.

Kata kunci: kriopreservasi; anggrek; suhu dingin; eksplan

**ABSTRACT**

*Orchid plants (Orchidaceae) have become important commodities in the international trades market because of their exoticism and flower endurance. Although the diversity of orchid species is ranked second after Asteraceae and number of hybrids are ranked first, but orchids face the threat of extinction and genetic degradation. Breeding programs, including such as crossing and insertion of superior genes, and in vitro propagation need to be supported by ensuring the availability of explants. In the context of maintaining storage for long-term needs, explants can be stored using cryopreservation techniques. This review aims to provide an overview of the progress of research in the field of cryopreservation, specifically orchid plants. Through a long-term storage program, superior genes and explants both for the development of hybrid orchids or in particular for the purpose of conservation of rare orchids can be ensured availability. In this review article various researches on cryopreservation techniques in seeds, protocorms, and pollen have been discussed in this article. Advances in technical development have been achieved, but many modifications are still needed so that a cryopreservation protocol can be applied to all orchid species and hybrids.*

*Keywords: cryopreservation; orchids; cold temperatures; explants*

**PENDAHULUAN**

Kriopreservasi merupakan suatu metode penyimpanan sel, jaringan, atau organ tanaman dalam temperatur sangat rendah (196° C di dalam nitrogen cair atau -150° C pada gas nitrogen) selama jangka waktu yang lama dengan mengurangi risiko munculnya variasi genetik dan fisiologis

(Reed 2008). Kriopreservasi bertujuan untuk menyimpan genotip-genotip unggul yang dipelihara dalam kondisi terkontrol, terbebas dari hama dan penyakit, serta pemeliharannya berbiaya rendah (Harvengt *et al.* 2004). Metode ini mampu menyimpan berbagai tipe organ dan jaringan, seperti

tunas, tunas pucuk, kepala sari, polen, biji, dan embrio somatik maupun zigotik.

Teknik kriopreservasi terdiri dari beberapa tipe. Teknik kriopreservasi konvensional berbasis pembekuan yang diinduksi dehidrasi, digunakan untuk menyimpan kultur yang belum berdiferensiasi dan pucuk-pucuk tanaman toleran terhadap suhu dingin (Engelmann 2004). Proses ini meliputi pendinginan secara bertahap terhadap jaringan sehingga terjadi prapembekuan, yang diikuti dengan pendinginan ekstrim terhadap sel dan mediumnya, dan terakhir adalah perendaman cepat dalam nitrogen cair (Mazur 1984). Dikarenakan mahalnya alat pendingin yang bisa diprogram untuk kondisi penyimpanan tersebut, prosedurnya seringkali menjadi lebih kompleks. Bagaimanapun, pembekuan secara perlahan juga dapat dilakukan dengan pendingin (*freezer*) biasa (Engelmann 1997).

Teknik kriopreservasi yang lebih maju, seperti prosedur berbasis vitrifikasi, mencakup dehidrasi sel sebelum dibekukan. Sampel sebelumnya dipaparkan pada suatu medium krioprotektif yang disebut dengan larutan vitrifikasi, dengan atau tanpa tambahan proses pengeringan udara (desikasi), kemudian diikuti dengan pendinginan cepat. Hal tersebut mencegah terbentuknya formasi es intraselular. Keuntungan dari prosedur vitrifikasi adalah pembekuannya sangat cepat, yang mana lebih cocok untuk organ yang kompleks, seperti tunas pucuk dan embrio. Organ ini terdiri dari beragam jenis sel, dan membutuhkan persyaratan tertentu sebelum perlakuan dehidrasi yang diinduksi pembekuan (Rao 2004). Sistem vitrifikasi lebih sederhana untuk dilakukan karena tidak membutuhkan pendingin yang terkontrol, mampu mencegah pembentukan formasi es, dan karenanya memungkinkan aplikasi yang lebih luas, dengan hanya sedikit modifikasi yang diperlukan untuk berbagai tipe sel (Engelmann 1997). Hal ini membuat sistem menjadi lebih efisien, sederhana, dan layak untuk dikomersilkan. Sistem kriopreservasi tersebut dapat

diaplikasikan dibanyak varietas tanaman, terutama tanaman keras di daerah beriklim tropis (Hirai dan Sakai 2003).

Terdapat 7 prosedur berbasis vitrifikasi yang telah dikembangkan dan dideskripsikan (Engelmann 2000; Panis *et al.* 2005), yaitu (1) Enkapsulasi-dehidrasi; (2) Vitrifikasi; (3) Enkapsulasi-vitrifikasi; (4) Dehidrasi; (5) Prapertumbuhan; (6) Pertumbuhan kembali-dehidrasi; dan (7) Tetesan beku.

Enkapsulasi-dehidrasi merupakan metode yang paling banyak dikembangkan untuk angrek terutama untuk enkapsulasi embrio somatik di dalam bola-bola kalsium alginat sebagai biji sintetis (Redenbaugh 1993). Teknik ini meliputi tahapan prakultur eksplan di medium cair yang mengandung sukrosa berkonsentrasi tinggi, diikuti desikasi parsial untuk menurunkan kadar air sebelum masuk ke nitrogen cair. Teknik ini mampu menghalangi pembentukan kristal es intraselular dan meningkatkan ketahanan eksplan, terutama untuk organ-organ sensitif pasca kriopreservasi, seperti embrio somatik, protokorm, dan *protocorm-like bodies* (PLBs) (Engelmann 2011). Banyak spesies tanaman telah disimpan dengan teknik enkapsulasi-dehidrasi (Reed 2008). Spesies tersebut diantaranya *Centaurea rigualii* (Gonzalez-Benito dan Perez 1997), *Medicago sativa* (Shibli *et al.* 2001), *Humulus lupulus* dan *Pelargonium* (Dumet *et al.* 2002), *Citrus* (Gonzalez-Arno *et al.* 2003), *Vitis* (Wang *et al.* 2004), *Cocos* (Fang *et al.* 2008), *Melia azedarach* (Scocchi *et al.* 2004), *Gentiana* (Suzuki *et al.* 2005), dan *Rubus* (Wang *et al.* 2005), serta banyak lainnya.

Beberapa angrek spesies dan hibrida telah berhasil dikriopreservasi, diantaranya *Doritaenopsis* (Tsukazaki *et al.* 2000), *Aerides odorata* (Hongthongkham dan Bunnag, 2014), *Bletilla striata* (Hirano *et al.* 2004), *Dendrobium* (Vendrame *et al.* 2008; Thammasiri, 2008; Antony *et al.* 2011; Mohanty *et al.* 2012), *Phalaenopsis bellina* (Khoddamzadeh *et al.* 2011), *Anoectochilus formosanus* (Shiau *et al.* 2002) dan lain sebagainya.

Teknik kriopreservasi telah banyak berkembang dan diterapkan untuk pemeliharaan biji, serbuk sari, protokorm, meristem, dan tunas pucuk pada banyak spesies dan hibrida anggrek. Tulisan ini mengulas tiga diantaranya yang sejauh ini paling banyak diteliti, yaitu kriopreservasi pada biji, protokorm, dan serbuk sari anggrek. Melalui artikel ini, diharapkan peneliti dan pemulia anggrek lainnya mendapatkan gambaran sejauh mana penelitian tentang kriopreservasi pada anggrek berkembang. Di masa depan, kebakuan protokol kriopreservasi anggrek perlu ditemukan agar program konservasi dan pemuliaan yang memerlukan eksplan-eksplan unggulan yang telah lama disimpan dalam kriopreservasi bisa berhasil.

### **KRIOPRESERVASI PADA BIJI ANGGREK**

Anggrek memiliki biji yang sangat kecil, diproduksi dalam jumlah banyak (ribuan hingga jutaan di dalam suatu kapsul), dan bijinya tidak memiliki daun lembaga. Adanya kapsul tersebut memungkinkan penyimpanan biji dari berbagai jenis anggrek tanpa terjadi pencampuran. Kriopreservasi untuk biji anggrek langka bermanfaat untuk mendukung program pemuliaan terutama peningkatan kualitas genetiknya (Vendrame *et al.* 2007).

Metode penyimpanan konvensional untuk biji secara umum, meliputi penggunaan temperatur  $-18^{\circ}\text{C}$  dan pengurangan kelembaban hingga 5%. Biji berbagai jenis anggrek dapat disimpan dalam kondisi serupa. Bagaimanapun, metode konvensional tersebut tidak direkomendasikan untuk penyimpanan jangka panjang dalam rangka konservasi plasma nutfah. Hal ini disebabkan karena tingginya variasi dalam viabilitas dan ketahanan biji selama pertumbuhan nantinya (Pritchard dan Seaton 1993). Se jauh ini data tentang viabilitas biji anggrek setelah bertahun-tahun penyimpanan masih sangat terbatas (Merritt *et al.* 2014).

Kondisi penyimpanan biji anggrek dipengaruhi oleh metode penyimpanan yang

digunakan, pemilihan spesies, dan jumlah biji (Vendrame *et al.* 2014). Viabilitas biji dari 30 spesies anggrek yang dikriopreservasi selama 3 tahun pada  $-10^{\circ}\text{C}$ , dengan masa penyimpanan tambahan selama lebih dari 10 tahun, berakibat pada kematian seluruh biji (Pritchard 1985). Penelitian Ito (1965) mengindikasikan bahwa biji seharusnya masih dalam kondisi segar ketika disimpan pada suhu  $-79^{\circ}\text{C}$ . Desikasi ringan juga perlu dipertimbangkan selama penyimpanan untuk alasan keberhasilan selama pemulihan biji.

Pada penelitian awal mengenai kriopreservasi, Pritchard *et al.* (1984) menunjukkan keberhasilan pemulihan biji dari 10 spesies anggrek setelah kriopreservasi, dimana biji tetap terjaga viabilitasnya. Bagaimanapun, seperti yang telah disebutkan sebelumnya, perbedaan jumlah biji yang disimpan dapat memengaruhi viabilitasnya. Seaton dan Hailes (1989) melaporkan biji *Guarianthe aurantiaca* kehilangan viabilitas ketika disimpan pada  $-18^{\circ}\text{C}$  selama 50 hari. Hal ini berbeda ketika biji-biji tersebut disimpan selama 400 hari pada kondisi yang sama menunjukkan viabilitas yang tinggi (Thornhill dan Koopowitz 1992).

Teknik kriopreservasi biji anggrek mengalami kemajuan beberapa tahun terakhir, dimana protokolnya lebih sederhana dan efektif untuk penyimpanan jangka panjang. Penggunaan teknik enkapsulasi-dehidrasi untuk kriopreservasi pada biji yang belum masak dari *Cyrtopodium hatschbachii* mampu meningkatkan keberhasilan perkecambahan sebesar 64% dan ketahanannya selama aklimatisasi setelah kriopreservasi (Surenciski *et al.* 2012). Galdiano Jr. *et al.* (2012) menerapkan krioprotektan jenis baru untuk kriopreservasi biji hibrida *Dendrobium*. Hasilnya menunjukkan bahwa penambahan 1% *phloroglucinol* dalam larutan previtrikasi (PVS2) menyebabkan laju perkecambahan meningkat 79% setelah perlakuan kriopreservasi dibandingkan dengan yang ditambahkan 1% Supercool X1000<sup>®</sup>. Hal tersebut menunjukkan tidak

adanya efek samping terhadap perkecambahan.

Teknik vitrifikasi mampu membuat protokol kriopreservasi menjadi lebih sederhana, aman, dan relatif murah. Bagaimanapun, kehadiran variasi somaklonal dapat disebabkan oleh eksplan yang memang secara genetis tidak stabil (Harding 2004; Panis dan Lambardi 2006) sebagai akibat dari paparan temperatur ekstrim dan efek samping dari krioprotektan. Galdiano Jr. *et al.* (2014) juga mengevaluasi stabilitas genetik menggunakan *flow-cytometry*, dan hasilnya mengonfirmasi bahwa integritas genetik dari bibit yang tumbuh dapat pulih pasca kriopreservasi.

### **KRIOPRESERVASI PADA PROTOKORM ANGGREK**

Salah satu eksplan yang paling sering digunakan untuk kultur in vitro anggrek adalah protokorm. Protokorm merupakan sebutan untuk embrio yang belum berdiferensiasi, namun telah memiliki kutub anterior yang akan membentuk tunas dan kutub posterior yang akan membentuk perakaran. Istilah protokorm hanya berlaku untuk Orchidaceae (Setiaji *et al.* 2018). Berbagai protokol kriopreservasi untuk protokorm anggrek telah dikembangkan baik untuk anggrek spesies dan hibrida. Preservasi protokorm bertujuan untuk menghasilkan regenerasi organ yang lebih cepat dibandingkan biji (Ishikawa *et al.* 1997).

Berbagai faktor memengaruhi pemulihan protokorm yang telah melalui kriopreservasi. Medium kultur diketahui berperan paling penting, seperti pada penelitian Popova *et al.* (2003), dimana pemilihan media kultur memengaruhi perkembangan protokorm asal biji dari hibrida *Bratonia* yang telah dikriopreservasi. Hasil optimal didapatkan dari medium Morel (Morel 1960) dan MS (Murashige dan Skoog 1962).

Hampir serupa dengan biji, pemilihan krioprotektan yang sesuai selama kriopreservasi penting untuk keberhasilan proses pemulihan protokorm yang telah dikriopreservasi. Kombinasi krioprotektan

telah dievaluasi untuk kriopreservasi protokorm anggrek, seperti pada *Dendrobium nobile* (Vendrame dan Faria 2011). Penggunaan 2 M larutan gliserol selama 20 menit yang dikombinasikan dengan larutan vitrifikasi (PVS2) dan 1% *phloroglucinol* selama 10 menit menunjukkan pemulihan terbaik (68%). Kriopreservasi protokorm hibrida *Dendrobium* 'Dong Yai' telah dievaluasi menggunakan dua macam protektan, yaitu *phloroglucinol* dan Supercool X1000 (Galdiano Jr. *et al.* 2012). Pada penelitian tersebut, praperlakuan protokorm diuji dengan 0,3 M sukrosa selama 24 jam, diikuti oleh pemaparan dengan larutan PVS2 yang mengandung 1% *phloroglucinol* atau 1% Supercool X1000 selama 15 menit pada 0 °C sebelum direndam dalam nitrogen cair. Tingkat keberhasilan pemulihan protokorm dievaluasi setelah 75 hari dan persentase perkecambahan lebih tinggi atau mirip dengan perkecambahan awal yang menggunakan 1% *phloroglucinol*. Beberapa penelitian menunjukkan potensi *phloroglucinol* sebagai alternatif krioprotektan.

Gogoi *et al.* (2012) membandingkan teknik vitrifikasi dan enkapsulasi-vitrifikasi untuk kriopreservasi protokorm *Cymbidium eburneum*. Tingkat regenerasi tertinggi (66%) didapatkan dari penggunaan teknik enkapsulasi-vitrifikasi. Mata-Rosas dan Lastre-Puertos (2015) membandingkan 4 teknik, yang meliputi enkapsulasi-dehidrasi, enkapsulasi-vitrifikasi, enkapsulasi-dehidrasi-vitrifikasi, dan vitrifikasi tunggal untuk kriopreservasi protokorm *Brassavola nodosa*. Hasilnya pemulihan dan pertumbuhan protokorm teramati pada semua metode. Penulis menyarankan penggunaan vitrifikasi tunggal dengan pertimbangan biaya yang murah dan teknik yang sederhana.

### **KRIOPRESERVASI PADA SERBUK SARI ANGGREK**

Pengembangan bank plasma nutfah memungkinkan pelestarian serbuk sari dari spesies langka, terancam dan/ atau hampir

punah. Penyimpanan jangka panjang serbuk sari penting untuk konservasi keanekaragaman genetik dan penggunaannya dalam program pemuliaan tanaman. Penyimpanan serbuk sari membantu pengembangan tanaman haploid melalui pengembangan embrio yang berasal dari serbuk sari (Pritchard dan Prendergast 1989). Penelitian kriopreservasi serbuk sari telah menghasilkan pedoman untuk penyimpanan sejumlah besar bahan genetik serta mendukung penelitian dasar dan terapan terhadap serbuk sari (Towill 2002; Ganeshan *et al.* 2008). Pritchard *et al.* (1999) menyarankan penggunaan kriopreservasi dalam bank plasma nutfah khusus anggrek yang berisi biji dan serbuk sari.

Penyimpanan serbuk sari yang tepat penting untuk memperbanyak dan reproduksi anggrek. Hal ini memungkinkan persilangan antara tanaman yang menunjukkan perbedaan temporal dan spasial dalam periode reproduksi seksual mereka (Vendrame *et al.* 2008). Temperatur penyimpanan serbuk sari bervariasi dari -20, -4 hingga 4 °C, dan temperatur yang lebih rendah lainnya sehingga serbuk sari memiliki umur yang lebih panjang dengan syarat kandungan air intraselular dipertahankan tetap rendah (Towill 2002).

Pada penelitian pendahuluan, Ito (1965) menyimpulkan serbuk sari segar dari berbagai jenis dan hibrida anggrek dapat dipreservasi pada temperatur sangat rendah (-79 °C), yang dikombinasikan dengan desikasi ringan untuk memperoleh pemulihan yang sesuai. Bagaimanapun, studi terkini dari Vendrame *et al.* (2008) melaporkan bahwa kriopreservasi serbuk sari dari dua hibrida *Dendrobium* dapat menggunakan penyimpanan yang sederhana dan langsung pada nitrogen cair tanpa membutuhkan praperlakuan atau krioprotektan. Efektivitas kriopreservasi telah dievaluasi menggunakan serbuk sari yang dipolinasi pada bunga sesama hibrida. Meskipun pengujian serbuk sari telah dilakukan pada berbagai perlakuan penyimpanan, tidak ada perbedaan

signifikan yang teramati diantara perlakuan dan kontrol. Semua bunga yang dipolinasi dengan serbuk sari asal kriopreservasi dari semua perlakuan dan kontrol mampu membentuk kapsul dan berisi biji-biji yang viabel.

## KESIMPULAN

Morfologi dan sifat biji, protokorm, dan serbuk sari pada anggrek beragam, jadi perlu penyesuaian teknik terhadapnya. Penyesuaian mungkin meliputi prosedur sterilisasi biji/ protokorm/ serbuk sari, jenis dan konsentrasi krioprotektan, waktu untuk prapembekuan (jika ada) sebelum kriopreservasi, prosedur pemulihan pasca kriopreservasi, modifikasi terhadap pertumbuhan dan perkembangan, kondisi lingkungan dan teknik *in vitro* yang digunakan, serta parameter lainnya. Teknik kriopreservasi yang telah dideskripsikan di atas bukanlah suatu teknik yang dapat diterapkan secara umum pada semua jenis dan hibrida anggrek. Hanya beberapa anggota dari genus yang memiliki nilai ekonomis dan/ atau konservasi yang telah diteliti, diantaranya *Doritaenopsis*, *Aerides*, *Bletilla*, *Dendrobium*, *Phalaenopsis*, dan *Anoectochilus*. Namun hasil-hasil riset tersebut telah menjadi pedoman bagi pengembangan protokol kriopreservasi untuk anggrek-anggrek lainnya.

## DAFTAR PUSTAKA

- Antony JJJ, Keng CL, Rathinam X, Marimuthu S, Subramaniam S (2011) Effect of preculture and PVS2 incubation conditions followed by histological analysis in the cryopreserved PLBs of *Dendrobium* 'Bobby Messina' orchid. Australian Journal of Crop Science 5:1557.
- Dumet D, Grapin A, Bailly C, Dorion N (2002) Revisiting crucial of an encapsulation/desiccation based cryopreservation and a range of cryopreservation techniques. CryoLetters 36(5):289–298
- Engelmann F (1997) In vitro conservation methods. In: Callow J, Ford-Lloyd B,

- Newbury HJ (eds) Biotechnology and plant
- Engelmann F (2000) Importance of cryopreservation for the conservation of plant genetic resources. In: Engelmann F, Takagi H (eds) Cryopreservation of tropical plant germplasm: current research progress and applications. JIRCAS, Tsukuba, pp 8–20
- Engelmann F (2004) Plant cryopreservation: progress and prospects. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 40:427–433
- Engelmann F (2011) Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 47:5–16
- Fang JY, Wetten A, Johnston J (2008) Headspace volatile markers for sensitivity of cocoa (*Theobroma cacao* L.) somatic embryos to cryopreservation. *Plant Cell Rep* 27:453–461
- Galdiano RF Jr, Lemos E, Vendrame W (2014) Seedling development and evaluation of genetic stability of cryopreserved *Dendrobium* hybrid mature seeds. *Appl Biochem Biotechnol* 172:2521–2529
- Galdiano RF Jr, Lemos EGM, Faria RT, Vendrame W (2012) Cryopreservation of *Dendrobium* hybrid seeds and protocorms as affected by phloroglucinol and supercool X1000. *Sci Hort* 148:154–160
- Ganeshan S, Rajasekharan PE, Shashikumar S, Decruze W (2008) Cryopreservation of pollen. In: Reed BM (ed) *Plant cryopreservation: a practical guide*. Springer, Berlin, pp 443–464
- Gogoi K, Kumaria S, Tandon P (2012) A comparative study of vitrification and encapsulation-vitrification for cryopreservation of protocorms genetic resources: conservation and use. CAB Intl., Wallingford, pp 119–161
- Gonzalez-Arno MT, Juárez J, Navarro L, Duran-Vila N (2003) Cryopreservation of ovules and somatic embryos of citrus using the encapsulation-dehydration technique. *CryoLetters* 24(2):85–94
- Gonzalez-Benito ME, Perez C (1997) Cryopreservation of nodal explants of an endangered plant species (*Centaurea rigualii* Esteve) using the encapsulation–dehydration method. *Biodivers Conserv* 6:583–590
- Harding K (2004) Genetic integrity of cryopreserved plant cells: a review. *CryoLetters* 25:3–22
- Harvengt L, Meier-Dinkel A, Dumas E, Collin E (2004) Establishment of a cryopreserved gene bank of European elms. *Can J For Res* 34:43–55
- Hirai D, Sakai A (2003) Simplified cryopreservation of sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] by optimizing conditions for osmoprotection. *Plant Cell Rep* 21:961–966
- Hirano T, Godo T, Mii M, Ishikawa K (2005) Cryopreservation of immature seeds of *Bletilla striata* by vitrification. *Plant Cell Rep* 23:534–539
- Hongthongkham J, Bunnag S (2014). *In vitro* propagation and cryopreservation of *Aerides odorata* Lour. (Orchidaceae). *Pakistan Journal of Biological Sciences* 17: 608-618
- 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 Rep* 16:754–757
- Ito I (1965) Ultra-low temperature storage of orchid pollinia and seeds. *Jpn Orchid Soc Bull* 11:4–15
- Khoddamzadeh AA, Sinniah UR, Lynch P, Kadir MA, Kadzimin SB, Mahmood M (2011) Cryopreservation of protocorm-like bodies (PLBs) of *Phalaenopsis bellina* (Rchb. f.) Christenson by encapsulation-dehydration. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 107:471-481.
- Mohanty P, Das MC, Kumaria S, Tandon P (2012) High-efficiency cryopreservation of the medicinal orchid *Dendrobium nobile* Lindl. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 109:297-305

- Mata-Rosas M, Lastre-Puertos E (2015) Longterm conservation of protocorms of *Brassavola nodosa* (L) Lind. (Orchidaceae): effect of ABA. *J Plant Physiol* 50:672–677
- Mazur P (1984) Freezing of living cells: mechanisms and applications. *Amer J Physiol Cell Physiol* 247:125–142
- Merritt DJ, Hay FR, Swarts ND, Sommerville KD, Dixon KW (2014) Ex situ conservation and cryopreservation of orchid germplasm. *Int J Plant Sci* 175:46–58
- Morel G (1960) Producing virus free *Cymbidium*. *Amer Orchid Soc Bull* 29:459–497
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473–497
- Panis B, Lambardi M (2006) Status of cryopreservation technology in plants (crops and forest trees). In: Ruane J, Sonnino A (eds) *The role of biotechnology in exploring and protecting agricultural genetic resources*. Food and Agriculture Organization, Rome, pp 61–78
- Panis B, Piette B, Swennen R (2005) Droplet vitrification of apical meristems: a cryopreservation protocol applicable to all Musaceae. *Plant Sci* 168:45–55
- Popova EV, Nikishina TV, Kolomeitseva GL, Popov AS (2003) The effect of seed cryopreservation on the development of protocorms by the hybrid orchid *Bratonia*. *Russian. J Plant Physiol* 50:672–677
- Pritchard HW (1984) Liquid nitrogen preservation of terrestrial and epiphytic orchid seed. *CryoLetters* 5:295–300
- Pritchard HW (1985) Growth and storage of orchid seeds. In: Tan KW (ed.) *Proc. eleventh world orchid conference*. 11<sup>th</sup> W.O.C., Miami, pp 290–293
- Pritchard HW, Prendergast FG (1989) Factors influencing the germination and storage characteristics of orchid pollen. In: Pritchard HW (ed) *Modern methods in orchid conservation: the role of physiology, ecology and management*. Cambridge University Press, Cambridge, pp 1–16
- Pritchard HW, Seaton PT (1993) Orchid seed storage: historical perspective, current status, and future prospects for long-term conservation. *Selbyana* 14:89–104
- Rao NK (2004) Plant genetic resources: advancing conservation and use through biotechnology. *Afr J Biotechnol* 3:136–145
- Redenbaugh K (1993) *Synseeds: applications of synthetic seeds to crop improvement*. CRC Press, Boca Raton, FL
- Reed BM (2008) *Plant cryopreservation: a practical guide*. Springer, New York
- Scocchi A, Faloci M, Medina R, Olmos S, Mroginski L (2004) Plant recovery of cryopreserved apical meristem-tips of *Melia azedarach* L. using encapsulation/dehydration and assessment of their genetic stability. *Euphytica* 135:29–38
- Seaton PT, Hailes SJ (1989) Effect of temperature and moisture content on the viability of *Cattleya aurantiaca* seed. In: Pritchard HW (ed) *Modern methods in orchid conservation: the role of physiology, ecology and management*. Cambridge University Press, Cambridge, pp 17–29
- Shiau YJ, Sagare AP, Chen UC, Yang SR, Tsay HS (2002) Conservation of *Anoectochilus formosanus* Hayata by artificial cross-pollination and in vitro culture of seeds. *Bot Bull Acad Sin* 43:123-130
- Shibli RA, Haagensohn DM, Cunningham SM, Berg WK, Volenec JJ (2001) Cryopreservation of alfalfa (*Medicago sativa* L.) cells by encapsulation-dehydration. *Plant Cell Rep* 20:445–450
- Surenciski MR, Gonzales EA, Terada G, Mroginski LA, Rey HY (2012) Cryopreservation of *Cyrtopodium hatschbachii* Pabst (Orchidaceae) immature seeds by encapsulation-dehydration. *Biocell* 36:31–36

- Suzuki M, Akihama T, Ishikawa M (2005) Cryopreservation of encapsulated gentian axillary buds following 2 step-preculture with sucrose and desiccation. *Plant Cell Tiss Org Cult* 83:115–121
- Thammasiri K (2008) Cryopreservation of some Thai orchid species. *Acta Hort* 788:53–62
- Thornhill A, Koopowitz H (1992) Viability of *Disa uniflora* Berg (Orchidaceae) seeds under variable storage conditions: is orchid gene banking possible? *Biol Conserv* 62:21–27
- Towill LE (2002) Cryopreservation of plant germplasm: introduction and some observations. In: Towill LE, Bajaj YPS (eds) *Cryopreservation of plant germplasm II*. Springer, Berlin, pp 4–21
- Tsukazaki H, Mii M, Tokuhara K, Ishikawa K (2000) Cryopreservation of *Doritaenopsis* suspension culture by vitrification. *Plant Cell Rep* 19:1160–1164
- Vendrame WA, Carvalho VS, Dias JMM, Maguire I (2008) Pollination of *Dendrobium* hybrids using cryopreserved pollen. *HortScience* 43:264–267
- Vendrame WA, Carvalho VS, Maguire I (2007) In vitro propagation and plantlet regeneration from *Doritaenopsis* purple gem ‘Ching Hua’ flower explants. *HortScience* 42(5):1256–1258
- Vendrame WA, Carvalho VS, Maguire I, Dias JMM (2007) In vitro germination and plant regeneration of cryopreserved *Dendrobium* hybrid mature seeds. *Sci Hort* 114:188–193
- Vendrame WA, Faria RT (2011) Phloroglucinol enhances recovery and survival of cryopreserved *Dendrobium nobile* protocorms. *Sci Hort* 128:131–135
- Wang Q, Laamanen J, Uosukainen M, Valkonen JPT (2005) Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of raspberry (*Rubus idaeus* L.) by encapsulation–vitrification and encapsulation–dehydration. *Plant Cell Rep* 24:280–288
- Wang QC, Mawassi M, Sahar N, Li P, Violeta CT, Gafny R, Sela I, Tanne E, Perl A (2004) Cryopreservation of grapevine (*Vitis* spp.) embryogenic cell suspensions by encapsulation–vitrification. *Plant Cell Tiss Org Cult* 77:267–275