

PRODUÇÃO DE MUDAS DE ORQUÍDEAS APÓS CRIOPRESERVAÇÃO
DAS SEMENTES EM NITROGÊNIO LÍQUIDO

Bruna Lana Campanenute Soares (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Jonson Rodrigues Farias Junior e Maria Auxiliadora Milaneze-Gutierre (Orientador), e-mail: milaneze@uem.br

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas

# Ciências Biológicas/Botânica

Palavras-chave: Orchidaceae, Kinetina, água de coco.

#### Resumo

A preservação das espécies vegetais tem sido motivo de preocupação há décadas, mas os métodos para a manutenção de propágulos em bancos de germoplasma ainda são pouco conhecidos, e dentre as técnicas de conservação da flora estão os bancos de sementes. Para as espécies com sementes pequenas, como as orquídeas, existe a possibilidade de perpetuação das amostras, por longo tempo, em nitrogênio líquido, mesmo sem tratamentos prévios. Objetivando analisar o desenvolvimento inicial de seis espécies de orquídeas nativas do Paraná, após criopreservação por três anos em nitrogênio líquido, amostras foram descongeladas, submetidas ao teste de viabilidade e semeadas sobre o meio de cultura de Knudson básico ou suplementado com água de coco ou kinetina. O método de criopreservação mostrou-se inadequado para Stanhopea lietzei, enquanto que para Mesadenella cuspidata nenhum meio de cultura mostrou-se adequado. As mais altas porcentagens de protocormos e plântulas estiveram relacionadas à presença da água de coco, exceto para Encyclia patens que também respondeu positivamente à presença de kin 0,5mg/L e 1mg/L.

# Introdução

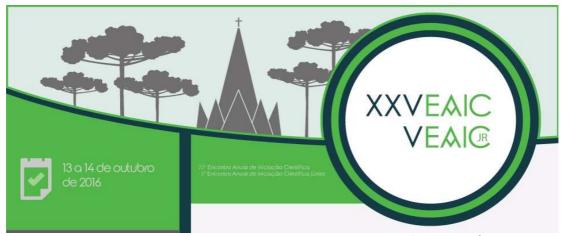
Os recursos genéticos vegetais são reservatórios naturais de genes com potencial de uso sustentável em produtos essenciais à humanidade, tais como alimentos, fibras e medicamentos, ou pelo simples fato de comporem uma floresta nativa. O cultivo *in vitro* é uma forma alternativa para a conservação *ex-situ*, além de ser um método que resulta na produção de











mudas em grande quantidade. Entretanto, a produção de plântulas de orquídeas *in vitro*, a partir de sementes cultivadas sem o fungo simbionte, depende, principalmente, de fatores intrínsecos, mas também aqueles relacionados com as condições de estocagem e das condições nutricionais do meio de cultura sobre o qual são semeadas. As sementes de orquídeas são muito pequenas e conhecidas pela baixa capacidade de se manterem viáveis em condições ambientais, mas segundo Pritchard (1984), podem ser criopreservadas em nitrogênio líquido sem qualquer tratamento prévio. Tendo em vista que pouco sabemos a respeito das especificidades das sementes de orquídeas brasileiras, após permanecerem conservadas por longo período em nitrogênio líquido, objetivou-se analisar o desenvolvimento inicial, *in vitro*, de seis espécies nativas do Paraná, a partir de sementes mantidas criopreservadas nesse tipo de banco de germoplasma.

## Materiais e métodos

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Cultivo de Orquídeas e Bromélias do Museu Dinâmico Interdisciplinar (UEM) com sementes de Encyclia patens Hook. (M99), Epidendrum densiflorum Hook. (M108), Epidendrum pseudodifforme Hoehne & Schltr. (M16), Grandiphyllum divaricatum (Lindl.) Docha Neto (M78), Coppensia flexuosa (Lodd.) Campacci (M143), Mesadenella cuspidata (Lindl.) Garay (M35) e Stanhopea lietzei (Regel) Schltr. (M07) armazenadas por três anos em nitrogênio líquido e provenientes da área Usina Hidrelétrica Mauá (Telêmaco Borba e Ortiqueira). Após descongeladas em temperatura ambiente, subamostras de sementes passaram pelo teste de viabilidade com cloreto de trifenil-tetrazólio (0,1%) e o restante semeado assimbioticamente (média de 50 sementes por réplica) sobre o meio de cultura Knudson (kc) (Knudson, 1946), kc com água de coco (100mL/L) (kc+coco) (Arditti et al., 1982) ou kc com kinetina 0,5mg/L, 1mg/L ou 2mg/L (kc+kin0,5; kc+kin1 e kc+kin2), permanecendo sob 25±3°C e iluminação contínua fluorescentes sob delineamento inteiramente casualizado e quatro réplicas. Após 6 meses de cultivo, as réplicas foram analisadas quanto ao número de protocormos (vivos ou mortos) e número de plântulas com gemas apical caulinar ou com a primeira uma ou mais folhas, sendo as médias comparadas pelo teste estatístico de Scoot-Knott.

## Resultados e Discussão











O teste de viabilidade mostrou que as sementes M99, M35, M16 permaneceram viáveis com 98,98%; 93,65% e 90,38%, respectivamente de embriões corados (viáveis), enquanto que as M78, M108, M143 apresentaram-se com 72,03%; 58,78 e 54,86%, respectivamente e M07 com apenas 6,25%. De acordo com a Tabela 1, verifica-se que as mais altas porcentagens de protocormos vivos e de plântulas estiveram relacionadas à presença da água de coco no meio de cultura, mas *Encyclia patens* também respondeu positivamente à presença de kin 0,5mg/L e 1mg/L.

**Tabela 1**: Análise das culturas *in vitro* de espécies de orquídeas paranaenses, elaboradas a partir de sementes criopreservadas em nitrogênio líquido por três anos.

	T //			1.40.5	1.470	1400	11100	11110
Fases	Trat./	M07	M16	M35	M78	M99	M108	M143
desenv.	espécies							
	kc	0,0 b	0,3 b	0,0 a	20,8 b	0,0 c	0,0 b	8,8 c
Protocor	kc+coco	0,0 b	2,5 a	0,8 a	32,5 a	0,0 c	0,0 b	46,0a
mos	kc+kin0,5	0,0 b	0,3 b	0,0 a	1,0 c	22,0 b	0,2 b	1,5 c
vivos	kc+kin1	0,5 a	0,5 b	0,3 a	3,0 c	31,1 b	3,2 a	1,5 c
	kc+kin2	0,0 b	0,0 b	0,0 a	0,8 c	45,3 a	6,2 a	0,8 c
Plântula	kc	0,0 b	0,5 b	0,0 a	0,5 b	0,0 b	9,8 a	0,0 b
com	kc+coco	4,0 a	1,5 a	0,0 a	4,3 a	14,3 a	2,2 b	8,3 a
gema	kc+kin0,5	0,0 b	1,0 b	0,0 a	0,8 b	10,8 a	1,6 b	2,0 b
apical	kc+kin1	0,0 b	0,0 b	0,0 a	0,5 b	14,5 a	5,0 b	1,8 b
caulinar	kc+kin2	0,0 b	0,0 b	0,0 a	0,0 b	5,3 b	11,0 a	2,3 b
	kc	0,0 b	0,8 a	0,0 a	0,0 b	0,0 b	13,2 a	0,0 b
Plântula	kc+coco	6,8 a	0,0 b	0,0 a	0,0 b	24,0 a	40,4 a	4,3a
com 1	kc+kin0,5	0,0 b	0,0 b	0,0 a	0,0 b	1,0 b	1,4 b	2,5 a
ou mais	kc+kin1	0,0 b	0,0 b	0,0 a	0,0 b	0,8 b	1,0 b	0,5 b
folhas	kc+kin2	0,0 b	0,0 b	0,0 a	0,0 b	0,0 b	1,0 b	0,3 b
	kc	0,0 b	0,0 a	0,0 a	0,5 b	0,0 c	6,8 b	0,0 b
Protocor	kc+coco	9,0 a	0,3 a	0,3 a	2,3 a	27,0 a	3,8 b	1,5 b
mos	kc+kin0,5	0,0 b	0,3 a	0,0 a	0,0 b	15,3 b	10,0 a	0,8 b
mortos	kc+kin1	0,0 b	0,0 a	0,3 a	2,0 a	9,8 b	10,4 a	0,8 b
	kc+kin2	0,0 b	0,0 a	0,0 a	0,5 b	14,0 b	2,0 b	0,0 b

As médias seguidas pela mesma letra nas colunas e pertencentes à mesma fase de desenvolvimento, não diferem entre si, ao nível de 5% pelo teste de Scoot-Knott.

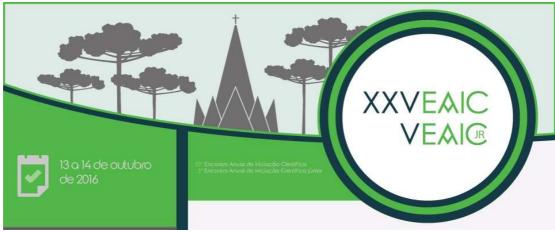
As sementes de *Mesadenella cuspidata* (M35) não responderam a nenhum dos tratamentos propostos, possivelmente por ser terrícola e necessitar de condições especiais de iluminação durante a fase de germinação de suas sementes, conforme proposto por Arditti et al. (1982) para outras espécies











de tipo de substrato. Steponkus e Webb (1992) já haviam ressaltado que o congelamento induz a danos celulares, tais como a desnaturação de proteínas, e precipitação de várias moléculas, e injúrias ao nível da membrana celular. Entretanto, visto que as citocininas estão relacionadas à divisão celular, sua presença no meio de cultura parece ter favorecer a manutenção das condições favoráveis à retomada do desenvolvimento dos embriões das espécies de orquídeas epífitas do presente estudo.

## Conclusões

A criopreservação de sementes em nitrogênio líquido sem tratamentos prévios, mostrou-se inadequado para *S. lietzei*, sendo a água de coco indispensável para a retomada do desenvolvimento dos poucos embriões que permaneceram viáveis, fato também observado para *Grandiphyllum divaricatum*, uma espécie em condição "vulnerável" quanto à preservação ambiental.

# **Agradecimentos**

Os autores agradecem ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos; à Eletrosul Centrais Elétricas S.A. pelo financiamento do convênio nº 88200021 e ao MEC/FNDE pelo financiamento do convênio nº 787487.

## Referências

ARDITTI, J. et al. Orchid seed germination and seedling culture - A manual. In: ARDITTI, J. (Ed.) **Orchid biology**: reviews and perspectives II. New York, Cornell University Press. p. 244-370. 1982.

KNUDSON, L. A new nutrient solution for germination of orchid seed. **American Orchid Society Bulletin**, v. 15, p. 214-217, 1946.

PRITCHARD, H.W. Liquid nitrogen preservation of terrestrial and epiphytic orchid seed. *Cryo Letters*, v. 5, p. 295–300, 1984.

STEPONKUS P.L.; WEBB, M.S. Freeze-induced dehydration and membrane destabilization in plants. *In*: SOMERO, G.; OSMOND, B. (eds). **Water and Life**: Comparative analysis of water relationships at the organismic, cellular and molecular level. SpringerVerlag: Berlin, 1992.







