



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-Gutierrez (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 simbiote, 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 Ortigueira). Após descongeladas em temperatura ambiente, subamostras de sementes passaram pelo teste de viabilidade com cloreto de trifetil-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 $25\pm 3^{\circ}\text{C}$ 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 Scott-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.

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

