

GERMINAÇÃO DE SEMENTES E DESENVOLVIMENTO INICIAL DE *Epidendrum pseudodifforme* (ORCHIDACEAE) APÓS CRIOPRESERVAÇÃO

Vanessa dos Santos (PIBIC/AF/IS/CNPq/FA/UEM), Maria Auxiliadora
Milaneze-Gutierrez (Orientador), e-mail: vanessa_qds@hotmail.com

Universidade Estadual de Maringá/Centro de Ciências Biológicas/Maringá,
PR.

Área: Botânica e subárea: Botânica Aplicada

Palavras-chave: Cultivo *in vitro*, orquídea, preservação ambiental

Resumo

A preservação de orquídeas é motivo de preocupação dos biólogos, e a busca por metodologias adequadas para a produção de mudas, em larga escala, faz-se necessária, pois tais sementes se mantêm viáveis por poucos meses, quando não mantidas em condições de temperatura ultrabaixa. Dentre as orquídeas endêmicas brasileiras está *Epidendrum pseudodifforme* ainda sem dados relacionados à produção de mudas para atender aos projetos de preservação ambiental, objetivando, o presente estudo, analisar a germinação de suas sementes, mantidas criopreservadas, bem como o desenvolvimento inicial das plântulas obtidas. As sementes de *E. pseudodifforme*, mantidas criopreservadas por quatro anos em nitrogênio líquido e um ano em freezer -80°C, foram descongeladas, embebidas em água destilada ou em solução de sacarose 10% por 24h, semeadas assimbioticamente sobre os meios de cultura KC (controle), KC+90g de polpa de banana ou KC+100mL/L de água de coco, permanecendo sob 25±3°C por 4 meses. As análises revelaram porcentagens de germinação abaixo de 5% em todos os meios de cultura, e apenas quando as sementes foram embebidas sacarose 10%. As maiores porcentagens de plântulas com 1-2 folhas foram obtidas na presença de polpa de banana (100,00%) e água de coco (65,22%), estatisticamente distintas entre si e do tratamento controle. O método de criopreservação não se mostrou eficiente para essa espécie de orquídea, e somente quando ao contrário da embebição das sementes em solução de sacarose 10%, antes da semeadura *in vitro*.

Introdução

Os recursos genéticos vegetais são reservatórios naturais de genes com potenciais usos sustentáveis para a humanidade, tais como alimentos, fibras e medicamentos (SOUZA et al., 2009), ou pelo simples fato de comporem uma floresta nativa. Entretanto, essa biodiversidade está sendo dizimada numa velocidade alarmante, devido ao crescimento desorganizado das fronteiras agrícolas e a exploração inadequada dos ecossistemas.

A fim de manter a biodiversidade de espécies, vários métodos de conservação *in situ* e *ex situ* de germoplasma vegetais já foram propostos, como medida de prevenção do processo de erosão genética, mas pouco sabemos das espécies nativas do Brasil.

As técnicas de criopreservação de germoplasma vegetal *ex situ* são relativamente simples e estão baseadas na vitrificação de tecidos ou órgãos, especialmente embriões, com a transição das moléculas de água do estado líquido para o estado vítreo, metaestável. No caso específico das pequenas sementes de orquídeas, existem propostas divergentes quanto à metodologia a ser empregada no momento da criação do banco de germoplasma sob temperaturas baixíssimas ou ultrabaixas em nitrogênio líquido, tendo alguns autores, como Carvalho (2006), afirmando a real necessidade do processo de vitrificação dos tecidos, enquanto que outros afirmam que a simples imersão das sementes de orquídeas em nitrogênio líquido mostra-se suficiente para mantê-las viáveis, mas com amplas variações de resultados, dependendo da espécie e mesmo do lote de sementes utilizado.

Embora as sementes possam ser mantidas criopreservadas por tempo indeterminado, segundo Carvalho (2006) durante o congelamento e/ou descongelamento podem ocorrer injúrias mecânica, decorrente da expansão da água e da conformação espacial dos cristais de gelo, culminando com a morte das células. De forma a evitar injúrias nas células dos embriões de orquídeas, Custódio et al. (2016) demonstraram que o uso da solução de glicose 10% ou sacarose 10% como pré-condicionamentos, durante o processo de embebição das sementes, é muito importante no processo de reativação desses pequenos embriões. Isso ocorre porque tais soluções mantêm um maior equilíbrio osmótico entre a semente e o meio externo, impedindo que a embebição em água pura cause injúrias à membrana celular.

Perante o contexto acima, objetivou-se analisar a germinação das sementes criopreservadas e o desenvolvimento inicial das plântulas de *Epidendrum pseudodiforme* Hoehne & Schletr.

Materiais e métodos

As sementes de *E. pseudodiforme*, utilizadas nos ensaios, foram coletadas na área de alagamento da UHE Mauá, município de Telêmaco Borba (PR), mantidas criopreservadas em nitrogênio líquido por quatro anos (imersão sem tratamentos prévios) e transferidas para freezer -80°C (COMCAP/UEM), onde permaneceram por mais um ano. Após, foram descongeladas à temperatura ambiente e embebidas em água destilada ou em solução de sacarose 10% por 24 horas. Amostras de ambos os tratamentos foram submetidas ao teste de viabilidade com cloreto de trifetil-tetrazólio, sendo consideradas viáveis aquelas com embrião corado em vermelho vivo. Para o cultivo *in vitro* as sementes foram inoculadas assimbioticamente sobre os meios de cultura KC (KNUDSON, 1946) ou meio básico, KC+90g de polpa de banana e KC+100mL/L de água de coco, e as

culturas mantidas sob $25\pm 3^{\circ}\text{C}$ e iluminação contínua Led Taschibra® (2 lâmpadas tubulares de 18 Watts) por 4 meses. Quatro réplicas por tratamento foram analisadas quanto às porcentagens de germinação, formação de protocormos com gema ou com 1 a 2 folhas, além da porcentagem de protocormos mortos. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os ensaios de cultivo *in vitro* de foram realizados no Laboratório de Cultivo de Orquídeas e Bromélias do Museu Dinâmico Interdisciplinar (MUDI/UEM).

Resultados e Discussão

O teste de viabilidade com as sementes embebidas em água destilada mostrou-se negativo, indicando que as sementes estavam mortas, enquanto que 17,98% daquelas embebidas em solução de sacarose 10% foram consideradas viáveis. De acordo com a Tabela 1, as porcentagens de germinação permaneceram abaixo de 5% em todos os meios de cultura, e apenas quando as sementes foram embebidas sacarose 10%, indicando que as condições oferecidas pelos meios de cultura não foram adequadas à reativação de todos os embriões considerados viáveis pelo teste com cloreto de trifeniltetrazólio.

Por sua vez, a presença da solução de sacarose, aparentemente, exerceu ação protetora aos embriões, mantendo a estabilidade das membranas biológicas, conforme puderam concluir Crowe et al. (1988), em relação a alguns açúcares (ex. sacarose e trealose), capazes de preservar a estrutura e as funções dos componentes das duas faces das membranas celulares e das proteínas solúveis associadas.

Tabela 1: Análise das culturas *in vitro* de *Epidendrum pseudodiforme*, após quatro meses na presença de diferentes meios de cultura.

Tipo de embebição das sementes	Meios de Cultura	% germinação	% proto. sem gema	% proto. com gema	% plântula com 1-2 folhas	% de proto. mortos
Água destilada	KC	0,00 b	0,00 c	0,00 c	0,00 d	0,00 b
	KC+Ba	0,00 b	0,00 c	0,00 c	0,00 d	0,00 b
	KC+Co	0,00 b	0,00 c	0,00 c	0,00 d	0,00 b
Sacarose 10%	KC	3,08 a	26,92 a	11,54 b	38,46 c	23,08 a
	KC+Ba	0,47 b	0,00 c	0,00 c	100,00 a	0,00 b
	KC+Co	2,72 a	8,70 b	21,74 a	65,22 b	0,25 b

proto.= protocormos ou primeira fase de desenvolvimento do embrião de orquídea; Ba (polpa de banana); Co (água de coco). As médias seguidas por letras iguais, numa mesma coluna, são estatisticamente semelhantes ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

A interferência positiva dos suplementos orgânicos presentes no meio de cultura, durante a fase de reativação celular dos embriões criopreservados, foi observada perante as maiores porcentagens de

plântulas com 1-2 folhas, obtidas na presença de polpa de banana (100,00%) e água de coco (65,22%), estatisticamente distintas entre si e do tratamento controle (Tabela 1), tendo Souza (2015) também concluído que a polpa de banana e a água de coco são suplementos eficazes para o cultivo de espécies de orquídeas.

Conclusões

O método de criopreservação, aplicado às sementes de *Epidendrum pseudodiforme* não se mostrou adequado. Entretanto, o método de embebição das sementes em solução com menor potencial hídrico (sacarose 10%) mostrou-se indispensável para a manutenção de embriões desta espécie.

Embora tenham sido obtidas porcentagens relativamente baixas de plântulas, esse número passa a ser expressivo perante os milhares de sementes produzidas em cada fruto da espécie analisada, as quais podem ser criopreservadas em pequeno espaço por longo período de tempo.

Agradecimentos

As autoras agradecem à Fundação Araucária e UEM pelo apoio financeiro; ao Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa (COMCAP) e ao MEC/FNDE pelo financiamento do convênio 787487/2013.

Referências

- CARVALHO, V.S. **Criopreservação de sementes e pólen de orquídeas**. 2006, 69f. Tese (Doutorado) - Programa de pós-graduação em Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa (MG), 2006.
- CUSTÓDIO, C.C. et al. Improved tetrazolium viably testing in orchid seeds with a thick carapace (*Dactylorhiza fuchsii*) or dark seed coat (*Vanda curvifolia*). **Seed Sci. Tech.**, v. 44, n. 1, p. 177-188, 2016.
- KNUDSON, L. A new nutrient solution for germination of orchid seed. **Americ. Orch. Soc. Bull.**, v.15, p.214-217, 1946.
- SOUZA, A. S. et al. **Preservação de germoplasma vegetal, com ênfase na conservação *in vitro* de variedade de mandioca**. Cruz das Almas: Embrapa CNPMF (Circular Técnica 90), 2009, 24p.
- SOUZA, G. R. B. **Desenvolvimento *in vitro* e criopreservação de sementes de orquídeas**. 2015. 53f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Unesp, Campus de Jaboticabal, 2015.
- CROWE, J. H. et al. Interactions of sugars with membranes. **Bioch. Biophysica Acta**, v. 947, p. 367-384, 1988.