

CULTIVO *IN VITRO* DE ORQUÍDEAS: EFEITO DOS MÉTODOS DE ARMAZENAMENTO DAS SEMENTES E DA COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA

Joyce Lisboa da Silva (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Maria Auxiliadora Milaneze-Gutierre (Orientador), e-mail: joycelisboa43@gmail.com

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

Área: Botânica, subárea: Botânica aplicada

Palavras-chave: Criopreservação, Freezer, Orchidaceae

Resumo

A produção de mudas de orquídeas, pelo método de cultivo *in vitro*, tem como principal gargalo o baixo tempo de viabilidade das sementes mantidas em temperatura ambiente. Objetivando analisar a influência do tipo de armazenamento das sementes e da composição do meio de cultura sobre a germinação das sementes e organogênese das plântulas obtidas, foram realizados ensaios assimióticos com três espécies nativas brasileiras sob delineamento experimental do tipo fatorial e na presença de iluminação LED contínua. As sementes de *Cattleya fidelensis* mantiveram-se viáveis nos cinco tipos de armazenamento propostos (temperatura ambiente com ou sem sílica gel, refrigerador comum com ou sem sílica gel e freezer -80°C), enquanto que as sementes de *C. nobilior* e *Epidendrum fulgens* o fizeram somente sob refrigerador sem sílica gel e em freezer -80°C. Com raras exceções, as maiores médias de plântulas com folhas e raízes foram observadas na presença de polpa de banana e/ou água de coco no meio de cultura. As plântulas mais vigorosas estiveram relacionadas ao armazenamento em freezer -80°C.

Introdução

O armazenamento de sementes, por longo período de tempo em temperatura baixíssima (criopreservação) na forma de bancos de germoplasma, especialmente em nitrogênio líquido (-196°C) é uma ferramenta para a conservação de espécies agrônômicas ou raras na natureza. Outros bancos de germoplasma são mantidos em temperatura mais elevadas, como no freezer -80°C, mais utilizado para o armazenamento de amostras zoológicas, esporos de fungos e de samambaias, além de sementes de orquídeas. Segundo Panis et al. (2001), a criopreservação garante, por longos períodos de tempo, a manutenção da estabilidade genética das amostras e evita contaminações por microrganismos.

As orquídeas são conhecidas pelo valor ornamental e como elemento importante da biodiversidade brasileira, e suas pequenas sementes são conhecidas pelo baixo tempo de viabilidade em temperatura ambiente. Estudos relacionados com a criopreservação de sementes de orquídeas são pouco relevantes frente ao número de espécies nativas e seus híbridos comerciais, tendo, o presente estudo, o objetivo de analisar as porcentagens de germinação e o desenvolvimento inicial de três espécies nativas, cujas sementes foram mantidas sob cinco formas de armazenamento.

Materiais e métodos

Para a execução dos ensaios foram utilizadas sementes maduras de *Cattleya fidelensis* (Pabst) Van den Berg, *C. nobilior* Rchb.f. e *Epidendrum fulgens* Brongn., fracionadas em lotes de 1g, resguardadas em envelopes de papel filtro e armazenadas em temperatura ambiente (TA) ($25\pm 3^{\circ}\text{C}$) com ou sem sílica gel; em refrigerador comum (RC) (7 a 10°C) com ou sem sílica gel; e em freezer -80°C .

Ao término do terceiro e do nono meses de armazenamento, um quarto de cada lote de sementes foi inoculado assimbioticamente sobre os meios de cultura: KC (KNUDSON, 1946); KC+90g de polpa de banana (KC+ban) e KC+10% de água de coco (KC+co) (ARDITTI et al., 1982), permanecendo sob $25\pm 3^{\circ}\text{C}$ e iluminação contínua LED (18 Watts/m^2). Aos terceiro e nono meses de cultivo, foram analisadas quatro réplicas por tratamento, quanto às porcentagens de germinação, de protocormos vivos (com ou sem gemas, folhas e raízes) e mortos. Os dados obtidos foram submetidos à ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knot.

Resultados e Discussão

Cattleya fidelensis foi a única espécie a manter suas sementes viáveis nos cinco tipos de armazenamento, ao término do terceiro mês de tratamento (Tabela 1), fato que reafirma a proposta de Fraga et al. (2008) de se tratar de um híbrido natural e, portanto, contar com os efeitos positivos do “vigor do híbrido F1” em suas sementes. Nesse período, a maior porcentagem de germinação foi obtida no lote de sementes mantido em refrigerador sem sílica gel (63,75%), na presença de água de coco, possivelmente devido às citocininas, vitaminas e sais minerais presentes nesse suplemento orgânico, os quais incrementaram a divisão celular dos embriões. A suplementação do meio de cultura com polpa de banana proporcionou maiores porcentagens de plântulas com folhas e raízes em todos os tratamentos oferecido (Tabela 1), comprovando as indicações de Arditti et al. (1982) em relação ao cultivo *in vitro* de orquídeas tropicais.

As sementes de *Cattleya nobilior* e *Epidendrum fulgens*, após três meses de armazenamento, apenas se mantiveram viáveis em refrigerador sem sílica gel e em freezer -80°C , com maiores porcentagens de germinação e organogênese das plântulas na presença de polpa de banana e/ou água de coco.

Tabela 1 - Análise das culturas assimbióticas de *Cattleya fidelensis* após três meses de armazenamento, em porcentagens.

Tipos de armazen.	Meios Cultura	Germi-nação	Protoc s/ gema	Protoc c/gema	Protoc c/folha	Protoc c/raiz	Protoc morto
TA sem sílica	KC	36,87bc	10,06c	89,94a	0,00c	0,00c	4,52ab
	KC+Ba	26,67bc	0,00d	49,21b	38,10a	12,70b	1,56c
	KC+Co	26,25bc	43,90b	55,28b	0,81c	0,00c	2,38c
TA com sílica	KC	35,58bc	15,53c	57,76b	25,47ab	1,24c	3,01c
	KC+Ba	19,58c	0,00d	34,04c	54,26a	11,70b	0,00c
	KC+Co	31,04bc	18,98c	81,02a	0,00c	0,00c	8,05ab
RC sem sílica	KC	45,21b	5,56cd	75,93ab	18,52b	0,00c	0,46c
	KC+Ba	47,08b	0,00d	47,11b	39,56a	13,33b	0,44c
	KC+Co	63,75a	33,44b	57,05b	8,85b	0,66c	0,33c
RC com sílica	KC	43,54b	9,27c	62,44b	28,29ab	0,00c	1,91c
	KC+Ba	26,25bc	8,06c	36,29c	33,87ab	21,77a	1,59c
	KC+Co	48,75b	30,60b	63,79b	5,60b	0,00c	0,85c
Freezer -80°C	KC	39,59bc	71,92a	27,40c	0,68c	0,00c	23,16a
	KC+Ba	52,08b	0,00d	45,20b	41,20a	13,60b	0,00c
	KC+Co	51,87b	18,55c	68,55b	12,10b	0,81c	0,40c

Protoc= protocormos, primeira fase do desenvolvimento do embrião de orquídea. Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si.

As mesmas respostas ao fator armazenamento foram observadas no nono mês de tratamento, para as três espécies de orquídeas (Tabela 2). Embora Cruz-Cruz et al. (2013) tenham afirmado que a criopreservação em nitrogênio líquido seja a única técnica capaz de garantir a segurança e a conservação, a longo prazo, de uma ampla variedade de espécies de plantas, para as espécies analisadas, o freezer -80°C mostrou-se como alternativa relevante, perante os resultados apresentados.

Quanto à organogênese das plântulas (Tabela 2), em *C. fidelensis* amplas interações ocorreram entre os tratamentos aplicados. Nas culturas de *C. nobilior*, o maior número de raízes foi obtido na presença de polpa de banana, independente do tipo de armazenamento das sementes, enquanto que diferenças estatísticas não foram observadas nas culturas de *E. fulgens*. Salienta-se que nas três espécies analisada, as plântulas mais vigorosas estiveram relacionadas ao armazenamento em freezer -80°C.

Conclusões

Para as três espécies de orquídeas analisadas, o armazenamento em freezer -80°C garantiu a preservação das sementes até, pelo menos, o nono mês. Ao contrário do esperado, as sementes de *C. fidelensis* mantiveram-se viáveis mesmo sob temperatura ambiente, fato incomum entre as orquídeas. As sementes de *C. nobilior* e *E. fulgens*, mostraram-se mais sensíveis à desidratação, mantendo-se viáveis quando mantidas em refrigerador comum na ausência de sílica gel.

Tabela 2 - Análise das culturas assimbióticas de três espécies de orquídeas, após nove meses de armazenamento.

Tipos armazen.	Meios de Cultura	<i>Cattleya fidelensis</i>		<i>Cattleya nobilior</i>		<i>Epidendrum fulgens</i>	
		nº folhas/plântula	nº raízes/plântula	nº folhas/plântula	nº raízes/plântula	nº folhas/plântula	nº raízes/plântula
TA sem sílica	KC	3,58 b	1,43 c	-	-	-	-
	KC+Ba	3,70 b	2,65 b	-	-	-	-
	KC+Co	4,20 a	0,97 d	-	-	-	-
TA com sílica	KC	3,72 b	1,54 c	-	-	-	-
	KC+Ba	3,82 ab	3,03 a	-	-	-	-
	KC+Co	3,80 b	0,92 d	-	-	-	-
RC sem sílica	KC	3,38 bc	1,49 c	3,67 a	1,42 c	2,75 a	2,30 a
	KC+Ba	3,07 c	2,03 b	4,22 a	7,32 a	3,45 a	3,22 a
	KC+Co	3,32 bc	1,10 c	4,84 a	3,42 b	3,69 a	2,35 a
RC com sílica	KC	3,77 b	1,20 c	-	-	-	-
	KC+Ba	3,82 b	3,00 a	-	-	-	-
	KC+Co	4,38 a	1,32 c	-	-	-	-
Freezer -80°C	KC	4,18 a	1,37 c	3,06 a	2,40 b	2,59 a	2,50 a
	KC+Ba	3,07 c	3,04 a	4,23 a	5,58 a	3,10 a	2,77 a
	KC+Co	4,34 a	0,74 d	4,44 a	3,15 b	3,65 a	3,03 a

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si.

Agradecimentos

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

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. 261-264, 1982.
- CRUZ-CRUZ, C. B.; GONZÁLEZ-ARNAO, M. T.; ENGELMANN, F. **biotechnology** and conservation of plant biodiversity. **Resources**, Cidade do México, v. 2, p. 73-95, 2013.
- FRAGA, C.N.; BORGES, R.A.X.; FONTANA, A. P. Notes on *Cattleya* Lindl. (Orchidaceae) from Brazil. **Neodiversity**, Feira de Santana, v. 3, p. 21-24, 2008.
- KNUDSON, L. A new nutrient solution for the germination of orchid seed. **American Orchid Society Bulletin**, Palm Beach, v. 14, p. 214-217, 1946.
- PANIS, B.; SWENNEN, R. Cryopreservation of plant germplasm. **Acta Horticulturae**, Bélgica, n. 560, p. 79-86, 2001.