

INFLUÊNCIA DO RECONGELAMENTO NA MANUTENÇÃO DA VIABILIDADE DAS SEMENTES DE *Cattleya tigrina* (ORCHIDACEAE)

Felipe Francisco dos Santos Dias (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Maria Auxiliadora Milaneze-Gutierrez (Orientador), e-mail: ra110677@uem.br

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas e da Saúde / Maringá, PR.

Área: Ciências Biológicas, subárea: Botânica

Palavras-chave: Criopreservação, Germoplasma, Orquídea

Resumo

Dentre as orquídeas endêmicas do Brasil está *Cattleya tigrina*, classificada como vulnerável quanto à categoria de ameaça, tendo este estudo o objetivo de verificar a influência do processo de congelamento sobre a manutenção da viabilidade de suas sementes. Ensaios de cultivo *in vitro* sobre meio de cultura "C" de Knudson básico (Kc) ou suplementado com água de coco (Kc+co) foram realizados com sementes mantidas congeladas por três anos em freezer -80°C , as quais foram descongeladas (método indireto) e recongeladas por mais duas vezes, após permanecerem por 24 h em temperatura ambiente. Os testes de viabilidade com cloreto de tetrazólio revelaram mais altas porcentagens de sementes viáveis no primeiro descongelamento (92,60%), com decréscimos sucessivos (89,00% e 88,10%). As porcentagens de germinação mantiveram-se entre 98,93% e 99,69%, sem diferenças significativas entre os tratamentos. Quedas no padrão de organogênese foram verificadas no segundo ensaio, quando comparado aos demais, mas tendo a presença de água de coco influenciado positivamente a organogênese de *C. tigrina* nos três ensaios realizados. O método de criopreservação, aplicado às sementes de *C. tigrina*, foi adequado mesmo após os três processos de descongelamento e recongelamento sucessivos, indicando que as sobras de sementes descongeladas podem retornar ao freezer -80°C para serem utilizadas em estudos futuros.

Introdução

Desde a antiguidade o homem translada as espécies vegetais de uma região para outra, seja para sua alimentação, com finalidade medicinal ou ornamental. Essas foram as primeiras utilizações de germoplasmas que, por definição, consistem em qualquer porção do corpo vegetal, mantido vivo e que contenha material genético capaz de gerar um novo indivíduo, tais como as sementes, estacas, grão de pólen ou explantes (Walter et al., 2005).

Dentre os tipos de banco de germoplasma para sementes está o nitrogênio líquido (-196°C , criopreservação), utilizado para a conservação de importantes espécies da

agricultura ou que sejam raras na natureza. Kulus e Zalewska (2014), em amplas revisões sobre criopreservação, afirmam que o congelamento em temperaturas baixas ou ultrabaixas, são métodos de armazenamento de germoplasma promissores e valiosos a longo prazo.

As orquídeas estão entre as plantas mais prestigiadas e cultivadas pelo homem, e por muito tempo foram extraídas da natureza com finalidade ornamental e/ou comercial. Tais fatos, juntamente com a destruição das florestas nativas, contribuiu para colocar várias destas espécies nas listas de plantas em risco de extinção.

O armazenamento das sementes de orquídeas é restrito, devido ao curto tempo de viabilidade em temperatura ambiente, não ultrapassando poucos meses. Entretanto, estudos anteriores realizados por diversos autores e também no Laboratório de Cultivo de Orquídeas e Bromélias do Mudi/UEM, têm comprovado que as sementes de orquídeas, ao serem congeladas em freezer -80°C , mantêm-se viáveis por vários anos.

Em geral, lotes de sementes são descongelados e semeados em seguida, não havendo relatos de recongelamento das sementes não utilizadas, em especial das espécies de orquídeas brasileiras. Portanto, objetiva-se verificar a influência do processo de recongelamento sobre a manutenção da viabilidade das sementes de *Cattleya tigrina* A. Rich., espécie de orquídea endêmica brasileira, em situação “vulnerável” quanto à preservação.

Materiais e métodos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultivo de Orquídeas e Bromélias do Mudi/UEM, com um lote de sementes maduras de *C. tigrina*, mantidas criopreservadas (sem tratamentos prévios) em freezer -80°C (COMCAP/UEM) por três anos. Para a preparação do primeiro ensaio de cultivo *in vitro*, o lote de sementes foi descongelado de forma indireta, conforme sugerido por Alvarez-Pardo e Ferreira (2006), e dele retirada uma alíquota de sementes (1 mg) a serem inoculadas *in vitro*. O restante do lote foi recongelado, em freezer -80°C , após 24 horas de permanência em temperatura ambiente ($25\pm 3^{\circ}\text{C}$).

Após 30 e 60 dias, os processos de descongelamento, recongelamento e semeadura *in vitro* foram repetidos. Para cada alíquota de sementes foram preparados testes de viabilidade com cloreto de trifetil tetrazólio e semeadura sobre o meio de cultura “C” de Knudson (1946) básico (Kc) ou suplementado com água de coco (Kc+co) com quatro réplicas por tratamento, permanecendo em sala climatizada a $25\pm 3^{\circ}\text{C}$ sob iluminação Led contínua. Somente o pH do meio Kc foi ajustado para 5,7 antes do processo de autoclavagem por 20 min a 1 atm, pois o meio Kc+co mantém-se tamponado neste valor.

As culturas de *C. tigrina* foram analisadas, aos 60 dias de cultivo, quanto às porcentagens de germinação e organogênese dos protocormos (embriões recém-germinados, indiferenciado, ainda sem gema apical caulinar) e plântulas (indivíduo com pelo menos uma folha). Os dados foram tabelados e comparados com base na estatística descritiva (média e desvio padrão).

Resultados e Discussão

Os testes de viabilidade, com cloreto de tetrazólio, revelaram mais altas porcentagens de sementes viáveis, de *C. tigrina*, no primeiro descongelamento (92,60%), com decréscimos sucessivos (89,00% e 88,10%).

As porcentagens germinação de sementes, *in vitro*, mantiveram-se entre $98,93 \pm 1,51$ (Kc) e $99,69 \pm 0,37$ (Kc+coco), ambas no segundo descongelamento, não havendo diferenças estatisticamente significativas entre elas e em relação aos demais tratamentos. Uma semente não germinada é mostrada na Figura 1A. Porcentagens de sementes germinadas em números superiores aos obtidos no teste de tetrazólio, principalmente após o primeiro descongelamento, condizem com os resultados de Alvarez-Pardo e Ferreira (2006) com *Cattleya intermedia* e de Hay et al. (2010), com espécies australianas, as quais apresentaram pequena redução ou até aumento no número de sementes germinadas após o recongelamento.

As porcentagens de protocormos mortos (Figura 1B) permaneceram abaixo de 2%, exceto sobre meio Kc no primeiro descongelamento, alcançando 17,06% e destacando-se estatisticamente dos demais tratamentos.

De acordo com a Tabela 1, quedas no padrão de organogênese foram verificadas nos protocormos e plântulas advindas do segundo descongelamento, quando comparado aos demais, ocorrendo altas porcentagens de protocormos com gema (94,06%) (Figura 1C) e raras plântulas com folhas (abaixo de 0,5%). A presença de água de coco, no meio de cultura, influenciou positivamente a organogênese de *C. tigrina* nos três ensaios realizados, com a presença de uma folha (Figura 1D) em 23,32% das plântulas do primeiro descongelamento e 25,46% do terceiro.

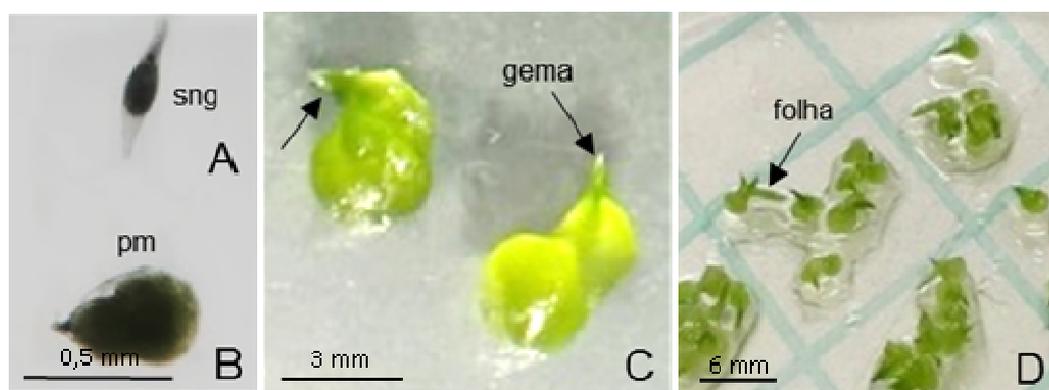


Figura 1 – *Cattleya tigrina*. Semente não germinada (sng) (A); Protocormo morto (pm) (B); Protocormos com gema e aspecto vitrificado (C) e Protocormos com aspectos normais, com gemas ou folhas (D).

Os resultados apresentados na Tabela 1 contradizem as conclusões de Alvarez-Pardo e Ferreira (2006) ao aconselharem que as sobras de sementes descongeladas não devem voltar para as condições de baixas temperaturas de armazenamento.

Tabela 1 - Desenvolvimento inicial de *Cattleya tigrina*, aos 60 dias de cultivo *in vitro*, após sucessivos descongelamentos e recongelamento das sementes (em %).

Descon- gelamen.	Meios Cultura	Protocormo indiferenc.	Protocormo com gema	Plântulas com 1 folha	Plântulas com 2 folha
D1	KC	6,96 ± 5,69	77,32 ± 7,81	15,72 ± 3,38	0,00
	KC+co	1,01 ± 1,43	71,37 ± 12,78	23,32 ± 6,64	4,31 ± 7,29
D2	KC	100,00	0,00	0,00	0,00
	KC+co	5,50 ± 1,41	94,06 ± 1,50	0,31 ± 0,37	0,14 ± 0,27
D3	KC	6,49 ± 1,27	92,85 ± 2,06	0,66 ± 1,32	0,00
	KC+co	20,16 ± 6,65	52,71 ± 7,48	25,46 ± 8,32	1,67 ± 2,22

Conclusões

O método de criopreservação, aplicado às sementes de *C. tigrina*, mostrou-se adequado mesmo após três processos de descongelamento e recongelamento sucessivos, indicando que as sobras de sementes descongeladas podem retornar ao freezer -80°C para serem utilizadas em estudos futuros.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq, à Fundação Araucária e à UEM pela bolsa de estudos do acadêmico de graduação, e ao Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa da UEM (COMCAP) pela cessão de uso do freezer -80°C.

Referências

ALVAREZ-PARDO, V.; FERREIRA, A.G. Armazenamento de sementes de orquídeas. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 28, n.2, p.92-98, 2006.

HAY, F. R. et al. Comparative longevity of Australian orchid (Orchidaceae) seeds under experimental and low temperature storage conditions. **Botanical Journal of the Linnean Society**, Oxford, v. 164, n. 1, p. 26-41, 2010.

KNUDSON, L. A. A new nutrient solution for germination of orchid seeds. **American Orchid Society Bulletin**, Palm Beach, v 15, p 214-7, 1946.

KULUS, D.; ZALEWSKA, M. Cryopreservation as a tool used in long-term storage of ornamental species – a review. **Scientia Horticulturae**, Netherlands, v. 168, p. 88-107, 2014.

WALTER, B. M. T.; CAVALVANTI, T. B.; BIANCHETTI, L. B.; VALLS, J. F. M. Coleta de germoplasma vegetal: relevância e conceitos básicos. *In*: WALTER, B. M. T.; CAVALCANTI, T. B. (Eds.) **Fundamentos para a coleta de germoplasma vegetal**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005, p. 89-138.