

Parâmetros para a produção e conversão de sementes sintéticas de orquídeas e avaliação de utilização na conservação *in vitro*.¹

Scherwinski-Pereira, Jonny Everson²; Oliveira, Janiffe Peres de³; Guedes, Rodrigo da Silva⁴; Costa, Frederico Henrique da Silva⁵; Fermino Jr., Paulo Cesar Poeta⁶

¹Trabalho realizado com o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.

²Pesquisador da Embrapa Acre, Laboratório de Morfogênese e Biologia Molecular – LABMOL - Caixa Postal 321, CEP 69908-970 Rio Branco, AC. E-mail: jonny@cpafac.embrapa.br. Bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq; ^{3,4} Mestrando em Produção Vegetal da Universidade Federal do Acre - UFAC, Rio Branco, AC. ⁵ Doutorando em Fitotecnia da Universidade Federal de Lavras, CEP 37200-000, Lavras, MG. ⁶Professor Assistente do Departamento de Ciências Agrárias da UFAC.

INTRODUÇÃO

A aplicação de técnicas de cultura de tecidos vegetais para a propagação de orquídeas têm sido considerada de grande importância para a expansão comercial destas plantas, o que se deve, entre outros fatores, a obtenção de clones com alto padrão genético e fitossanitário, bem como pela alta taxa de germinação das sementes *in vitro*. Adicionalmente, possibilita que espécies raras e em extinção sejam resgatadas, reintroduzidas em seu habitat e conservadas em bancos de germoplasma *in vitro* (Martin, 2003).

Nesse contexto, destaca-se a tecnologia de sementes sintéticas, uma ferramenta biotecnológica que tem ganhado destaque nos últimos tempos em razão da facilidade de produção e manipulação de propágulos, abrindo perspectivas promissoras em áreas como a de intercâmbio de germoplasma (Datta et al., 1999; Divakaran et al., 2006), conservação de germoplasma vegetal *in vitro* (Datta et al., 1999; Martin, 2003) e produção massal de propágulos (Danso & Ford-Lloyd, 2003; Martin, 2003).

Diante do exposto e devido aos poucos estudos a respeito de aspectos básicos da produção de sementes artificiais e seu emprego na conservação de germoplasma *in vitro* em espécies de orquídeas, objetivou-se otimizar parâmetros para a produção e conversão de sementes sintéticas de orquídeas e avaliar a utilização desta técnica na conservação *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

Como unidades de encapsulamento foram utilizadas microplantas de orquídea *Cattleya* sp (com cerca de 0,3 mm) (Figura 1A), obtidas por meio da germinação assimbiótica *in vitro* de sementes. Inicialmente, os propágulos foram misturados à matriz de alginato de sódio e com o auxílio de uma pipeta automática e ponteira autoclavada (ajustada para 350 µL), foram individualmente resgatadas e gotejadas em solução de CaCl₂.2H₂O (Cloreto de sódio) (50mM) para a solidificação da cápsula (complexação), permanecendo sob esta condição por períodos determinados de acordo com os experimentos. Seguindo a etapa de complexação, as cápsulas foram submetidas a tríplice lavagem em água destilada e esterilizada, sendo imediatamente imersas em solução de KNO₃ (Nitrato de potássio) (100mM) por 20 minutos para a descomplexação. Posteriormente, realizou-se nova tríplice lavagem das cápsulas e logo após sua transferência para frascos de 250 mL contendo 40 mL de meio de MS (Murashige & Skoog, 1962) para a germinação (Figura 1C-D).

Num primeiro experimento, a influência da constituição (água ou sais e vitaminas de MS), associado à consistência da cápsula (alginato de sódio Synth[®] a 1% ou 2%) foram estudados. O tempo de complexação utilizado foi de 15 minutos. Após quinze, trinta e sessenta dias da transferência *in vitro*, o percentual de germinação foi avaliado. No segundo experimento, estudou-se a constituição (água ou MS pleno) e consistência da cápsula (alginato de sódio Synth[®] a 1% ou 2%), associados ao tempo de complexação (10, 20 e 30

¹ Trabalho realizado com o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq.

minutos), sendo a percentagem de germinação avaliada aos sessenta dias de cultivo. Posteriormente, um terceiro experimento foi realizado visando avaliar a conservação *in vitro* das microplantas de orquídeas encapsuladas. Para isso, diferentes tempos de conservação (0, 30, 60, 90, 120 e 150 dias) e dois gêneros de orquídeas (*Cattleya* sp e *Epidendro* sp.) foram avaliados. A matriz de encapsulamento foi constituída de alginato de sódio a 2% e meio MS pleno, com tempo de complexação e descomplexação de 20 minutos em solução de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (50mM) e KNO_3 (100mM). O armazenamento foi em frascos de 250 mL desprovido de meio de cultura mantidos em câmara tipo BOD a 8°C sob condições de escuro. Um grupo de microplantas encapsuladas foi mantido sob condições de sala de crescimento sobre meio semi-sólido de MS. Decorrido cada período de armazenamento, as cápsulas foram submetidas ao processo de descomplexação, transferidas para meio de cultura semi-sólido de MS e mantidas em sala de crescimento, efetuando-se a avaliação de germinação a cada 15 dias por até 150 dias.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, sendo cada tratamento formado por cinco repetições com 10 unidades encapsuladas por parcela. Os dados obtidos foram analisados com o emprego do programa estatístico SANEST (Zonta & Machado, 1984) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Dados expressos em percentagem (x) foram transformados segundo arco seno $(x/100)^{0,5}$

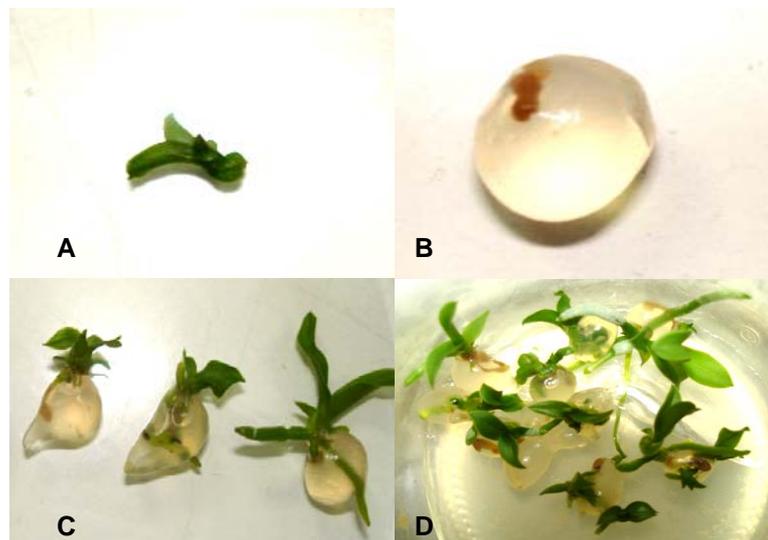


Figura 1. A - Aspecto das microplantas de orquídea selecionadas para encapsulamento; B – Aspecto da cápsula de alginato de sódio com microplanta morta; C – Microplantas de orquídea encapsuladas em fase de germinação (detalhe do rompimento da cápsula); D – Aspecto geral das microplantas encapsuladas e inoculadas em frascos contendo meio MS.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento 1

Em ambas as concentrações de alginato avaliadas (1% e 2%), diferenças significativas entre a constituição da cápsula foram observadas apenas aos 30 dias de avaliação, obtendo-se maior taxa de germinação pela adição de água e meio MS à matriz de encapsulamento, respectivamente. Já em relação ao fator época de avaliação, melhores resultados foram obtidos aos 60 dias de cultura, independentemente da constituição e consistência da cápsula (Tabela 1).

Alto percentual de germinação *in vitro* (80%) de sementes sintéticas foi verificado por Datta et al. (1999) ao encapsular protocormos de *Geodorum densiflorum* em matriz provida de meio Knudson (KC) adicionada de 4% de alginato de sódio e cultivadas em meio sólido, acrescido de peptona, água de coco, N^6 -benzilaminopurina (BAP) e ácido naftalenoacético (ANA).

Diferentes respostas dos propágulos encapsulados, em relação às taxas de germinação, têm sido verificadas com o uso da tecnologia de sementes sintéticas, devido especialmente aos diferentes tipos de propágulos empregados no encapsulamento, tipos comerciais de alginato de sódio e substratos para germinação e regeneração das sementes sintéticas.

Tabela 1. Efeito da constituição da cápsula e concentração de alginato de sódio no percentual de emergência *in vitro* de microplantas encapsuladas de orquídea aos 15, 30 e 60 dias da semeadura em meio MS sólido.

<u>Época de avaliação (Dias)</u>	<u>Alginato 1%</u>		<u>Alginato 2%</u>	
	----- <u>Constituição</u> -----			
	<u>H₂O</u>	<u>MS</u>	<u>H₂O</u>	<u>MS</u>
15	8,3 bA	3,5 cA	5,0 cA	3,7 cA
30	41,3 aA	23,7 bB	23,8 bB	31,3 bA
60	55,1 aA	42,7 aA	58,5 aA	69,4 aA

Médias seguidas por letras distintas diferem estatisticamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Experimento 2

A adição de meio MS a matriz de encapsulamento quando associado à concentração de 2% de alginato, aos 60 dias da semeadura, proporcionou melhores percentuais de germinação que à utilização de água, independentemente do tempo de complexação. Quanto à consistência da cápsula, o emprego de alginato de sódio a 2% promoveu resultados significativamente superiores à concentração de 1% (Tabela 2). Este resultado está em concordância com Ipekci & Gozukumizi (2003), o qual afirmam que o uso de baixas concentrações de alginato de sódio não promove boa uniformidade e firmeza das cápsulas, resultando em baixa frequência de germinação.

Tabela 2. Efeito da constituição da cápsula, concentração de alginato e tempo de complexação sobre a percentagem de emergência de orquídeas oriundas do encapsulamento de microplantas aos 60 dias da semeadura em meio MS sólido.

<u>Tempo de complexação (min)</u>	<u>Alginato 1%</u>		<u>Alginato 2%</u>	
	----- <u>Constituição</u> -----			
	<u>H₂O</u>	<u>MS</u>	<u>H₂O</u>	<u>MS</u>
10	60,10	44,59	57,52	62,66
20	44,86	47,48	58,00	71,43
30	60,10	36,07	60,10	73,77
Média (Constituição)	55,06	42,67	58,54	69,38
Média (Alginato)	48,86 B		63,96 A	

Médias seguidas por letras distintas diferem estatisticamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Experimento 3

A conservação *in vitro* das microplantas encapsuladas a 8°C demonstrou haver uma tendência de redução na percentagem de germinação com o aumento do período de armazenamento, independente do gênero estudado. De modo geral, foi observado que no gênero *Cattleya* sp. houve uma germinação média entre 34% e 38% até os 90 dias de armazenamento, após o qual nenhuma germinação foi verificada. Já as microplantas encapsuladas não armazenadas tiveram cerca de 92% de germinação (Figura 2A). Por outro lado, uma acentuada redução na germinação foi observada para o gênero *Epidendro* sp., sendo a máxima germinação (26%) obtida aos 30 dias de armazenamento (Figura 2B). Resultados semelhantes e também promissores pelo uso da técnica de sementes sintéticas para a conservação *in vitro* de orquídeas foram obtidos por Sharma et al. (1992), Chetia et al. (1998), Datta et al. (1999) e Divakaran et al. (2006).

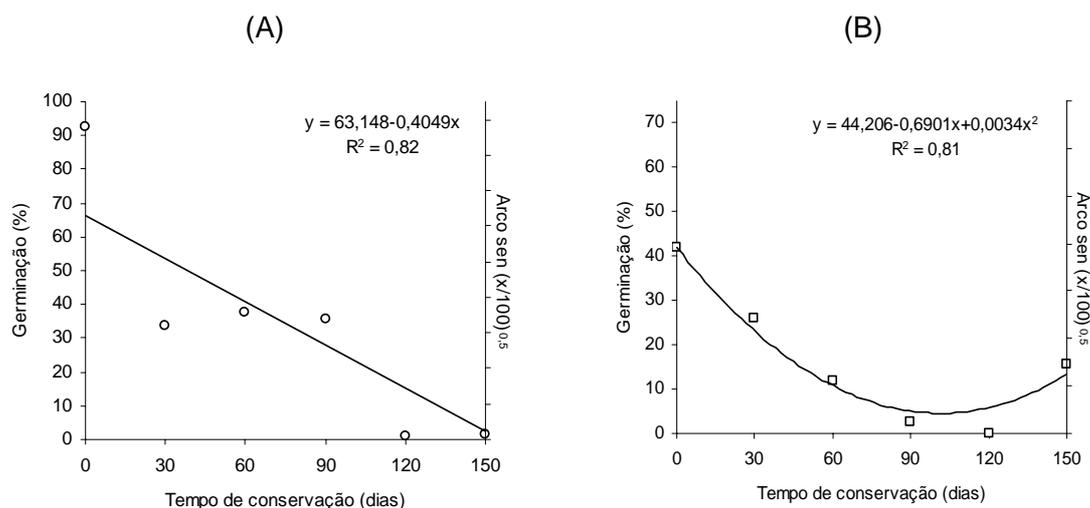


Figura 2. Percentagem de germinação de sementes sintéticas de orquídeas em razão do tempo de conservação *in vitro* (dias) à temperatura de 8°C: (A) *Cattleya* sp. e (B) *Epidendro* sp.

CONCLUSÕES

O emprego de uma matriz de encapsulamento contendo meio de MS associado a 2% de alginato de sódio possibilita a obtenção de sementes sintéticas de *Cattleya* sp com satisfatórias taxas de germinação *in vitro*. A técnica de encapsulamento apresenta potencial para utilização na conservação *in vitro* de orquídeas. Melhorias no processo de conservação *in vitro* ainda são necessárias para a obtenção de elevadas taxas de germinação associada a um maior período de armazenamento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CHETIA, S.; DEKA, P.C.; DEVI, J. Germination of fresh and stored encapsulated protocorms of orchids. **Indian Journal of experimental Biology**, v.36, p.108-111, 1998.
- DANSO, K.E. & FORD-LLOYD, B.V. Encapsulation of nodal cuttings and shoot tips for storage and exchange of cassava germplasm. **Plant Cell Reports**, v.21, p.718-725, 2003.
- DATTA, K.B.; KANJILAL, B.; DE SARKER, D. Artificial seed technology: development of a protocol in *Geodorum densiflorum* (Lam) Schltr. – an endangered orchid. **Current Science**, v.76, p.1142-1145, 1999.
- DIVAKARAN, M.; BABU, K.N.; PETER, K.V. Conservation of *Vanilla* species, *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, v.110, p.175-180, 2006.
- IPEKCI, Z.; GOZUKIRMIZI, N. Direct somatic embryogenesis and synthetic seed production from *Paulownia elongata*. **Plant Cell Reports**, v.22, p.16-24, 2003.
- MARTIN, K.P. Clonal propagation, encapsulation and reintroduction of *Ipsea malabarica* (REICHB. f.) J. D. Hook., an endangered orchid. **In vitro Cellular Development Biology – Plant**, v.39, p.322-326, 2003.
- MURASHIGE, T.; SKOOG F. A. Revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, n.3, p.473-497, 1962.
- SHARMA, A.; TANDON, P.; KUMAR, A. Regeneration of *Dendrobium wardianum* Warner. (orchidaceae) from synthetic seeds. **International Journal of Agriculture & Biology**, v.30, p.747-748, 1992.
- ZONTA, E.P.; MACHADO, A.A. SANEST - **Sistema de Análise Estatística para microcomputadores**. Pelotas: UFPel, SEI, 1984, 138p.

PALAVRAS-CHAVE

Orchidaceae; encapsulamento; unidades encapsuláveis; preservação; micropropagação.