

TESTE DE DETERIOÇÃO CONTROLADA EM SEMENTES DE QUATRO ESPÉCIES DE ORQUÍDEAS PARA AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO FISIOLÓGICO

Jéssica Fontes Fileti, Silvério Takao Hosomi, Ceci Castilho Custódio, Nelson Barbosa Machado-Neto

Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE, Programa de Pós Graduação em Agronomia, Presidente Prudente, SP. E-mail: nbmneto@unoeste.br

RESUMO

Uma alternativa para conservação de espécies é um banco de sementes, onde é possível conservar e propagar estas plantas, porém para isto é necessário se ter uma noção da qualidade das sementes estocadas. Uma alternativa é utilizar testes de vigor, entre eles a deterioração controlada. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da deterioração controlada sobre sementes de orquídeas e determinar qual o tempo de exposição destas a este tipo de tratamento. Sementes de *Cattleya schilleriana*, *C. tigrina*, *C. crispata* e *C. labiata* foram submetidas à deterioração de zero a 48h a 43°C. Para sementes de *C. crispata* não foi encontrado um período adequado para o teste de deterioração controlada. Recomenda-se para as sementes de *C. tigrina*, *C. labiata* e *C. schilleriana* a utilização de 27 h a 43°C, todavia variáveis como o tempo e a temperatura ainda precisam ser melhores estabelecidos para este grupo de plantas. O teste de tetrazólio não foi eficiente para avaliar a qualidade das sementes após a deterioração controlada.

Palavras-chave: Envelhecimento; Orchidaceae, *Cattleya*; Banco de sementes.

CONTROLLED DETERIORATION TEST IN SEEDS OF FOUR ORCHIDS' SPECIES TO EVALUATE THE PHYSIOLOGICAL BEHAVIOR

ABSTRACT

An alternative for conservation of this species is seed banking, based in that is possible to make conservation and propagations of the endangered species. But for this the seed quality must be monitored. Vigour tests can offer an option, and one of this is the controlled deterioration, which expose the seeds with high moisture to high temperatures during a determined period of time. The present work aimed to evaluate the controlled deterioration test over four orchid species in different times. Seeds of *C. schilleriana*, *C. tigrina*, *C. crispata* and *C. labiata* was submitted to deterioration from times ranging from zero to 48h at 43°C. For *Cattleya crispata* it was not found a effective time for the test. did not suffer any deterioration at any time. It is recommended for *C. tigrina*, *C. labiata* and *C. schilleriana* the use of 27 h at 43°C. However, time and temperature should be better studied for this group of plants. Tetrazolium test was not efficient to evaluate the seed quality after controlled deterioration.

Keywords: Ageing; Orchidaceae, *Cattleya*; Seed Bank.

INTRODUÇÃO

As orquídeas representam o maior grupo entre as angiospermas em número com cerca de 20000 a 35000 espécies sendo que, no Brasil, há cerca de 10% das espécies desse grupo (DRESSLER, 2005; SOUZA; LORENZI, 2008), ocorrendo em quase todos os ecossistemas da terra com exceção da zona polar (NIKISHINA et al., 2001, 2007). Algumas espécies têm grande importância econômica, um exemplo é a essência de baunilha extraída dos frutos de *Vanilla planifolia*; outras possuem alto valor ornamental, como por exemplo, as *Cattleyas*, *Phalaenopsis*, *Dendrobium* (JUDD et al., 2009). A sua intensa exploração tem acarretado extinção de espécies, além da degradação do seu habitat natural

(HOSOMI et al., 2011). A exploração do habitat também é fator que colabora para o desaparecimento de muitas espécies (KOOPOWITZ, 2001).

O estabelecimento de bancos de sementes é fundamental para a conservação das espécies cultivadas e silvestres (ALVAREZ-PARDO; FERREIRA 2006; SEATON; PRITCHARD, 2008). As informações para armazenamento de sementes de orquídeas são limitadas, havendo ainda divergências entre autores quanto as condições mais adequadas (SHOUSHTARI et al., 1994; PRITCHARD; SEATON, 1993; PRITCHARD et al., 1999; MACHADO NETO; CUSTÓDIO, 2005a; SEATON; PRITCHARD, 2008). Algumas podem ter duração curta, apenas três meses, quando

armazenadas secas a 4°C (MACHADO NETO; CUSTÓDIO, 2005b), enquanto o armazenamento em temperatura mais baixa (sub-zero, -18°C) é considerado mais adequado para armazenamento de longo prazo (SEATON; PRITCHARD, 2008).

Apesar de algumas orquídeas, ameaçadas de extinção, poderem ser propagadas em meio apropriado *in vitro* a partir de sementes (LONG et al., 2010; DUTRA et al., 2009; ÁVILA-DIAZ et al., 2009, HOSOMI et al., 2012), esta não é uma estratégia fácil de seguir para todos os taxóns. Além disso, as sementes de algumas espécies não podem ser armazenadas a baixa temperatura e umidade, pois expressam características intermediárias ou recalcitrantes, uma vez que não toleram dessecação, ou armazenamento em condições de câmara fria (MACHADO NETO; CUSTÓDIO, 2005b), por não se apresentarem como ortodoxas clássicas (ELLIS; HONG, 2007). Como alternativa, bancos de semente têm o potencial de longo prazo de armazenamento de um grande número de propágulos (IUCN, 1996; MACHADO NETO; CUSTÓDIO, 2005b), o que seria facilitado em orquídeas, pois como as sementes destas são pequenas, cada cápsula pode conter de centenas a milhões de sementes (ARDITTI; GHANI, 2000).

Os testes de vigor avaliam o potencial fisiológico das sementes e fornecem informações adicionais ao teste de germinação, sendo utilizados na identificação de diferenças no potencial fisiológico de lotes que apresentam semelhanças na porcentagem de germinação (DUTRA; MEDEIROS FILHO, 2008).

A deterioração controlada foi desenvolvida para avaliar a qualidade de sementes pequenas. As sementes são submetidas à alta temperatura e umidade relativa por tempo determinado para que possam ter o umedecimento desejado. O grau de umidade das sementes é ajustado para serem submetidas à alta temperatura (DUTRA; MEDEIROS FILHO, 2008). Por ter amostras com conteúdo de água semelhante, obtêm-se condições mais uniformes durante o teste e uma padronização mais efetiva (LEEUWEN et al., 2005).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da deterioração controlada em sementes de 4 espécies de orquídeas (*C. tigrina*, *C. labiata*, *C. crispata* e *C. schilleriana*).

MATERIAL E MÉTODOS

Material Biológico

As cápsulas foram obtidas por polinização cruzada. A colheita foi realizada em períodos diferentes para acomodar os diferentes tempos de maturação. Os frutos foram deixados em sacos de papel e mantidos sob condições ambientais até deiscência completa. As sementes de cada espécie foram limpas, colocadas em sacos de papel fino até atingirem equilíbrio higroscópico sobre uma solução saturada de cloreto de lítio a 25°C por uma semana. O grau de umidade foi aferido gravimetricamente com 3 repetições de 20 mg colocados em tubos de 200 µL e deixados em estufa a 105°C por 24h obtendo um valor de $3 \pm 1\%$ de teor de água (BRASIL. Ministério da Agricultura, 2009).

As sementes foram equilibradas a 20% de umidade com acréscimo de água e divididas em sub-amostras, as quais foram condicionadas em sacos de polietileno e submetidas a 43°C por diferentes tempos (0, 30min, 1h, 1h30min, 2, 3, 6, 12, 24 e 48 h).

Teste de germinação

Os testes de germinação foram realizados em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) à meia concentração, contendo ágar (6 g L^{-1}) e o pH ajustado para 5,6 (com NaOH) antes da autoclavagem, após o que o meio foi dispensado em placas-de-Petri de 80 mm. Antes da semeadura, 10 mg de cada lote de sementes foi desinfetado com uma solução de dicloroisocianurato de sódio (NaDCC; 5 g L^{-1}) contendo 100 µl de Tween 80, por 10 minutos. As sementes foram lavadas duas vezes com água destilada estéril e colocadas no meio. A semeadura foi realizada em uma capela de fluxo laminar de acordo com Machado Neto e Custódio (2005a). Duas placas de Petri foram usadas por espécie, seladas com filme de PVC e transferidas para uma sala de crescimento a $25 \pm 3^\circ\text{C}$ com fotoperíodo 16 h.

As sementes germinadas foram medidas como o número de sementes germinadas totais e pelo índice de velocidade de germinação. Foram contadas semanalmente em três campos marcados em cada placa de Petri. As imagens foram capturadas com uma câmera digital Sony DSC-P10, acoplado manualmente à lente ocular de um estereomicroscópio, e foram analisadas como descrito anteriormente. As sementes foram consideradas como germinadas quando elas tiverem a massa embrionária expandida e

coloração verde (estágio 1) de acordo com o método de Seaton e Hailes (1989).

Teste de tetrazólio

A vitalidade foi avaliada através de um TZ modificado, utilizando três repetições por amostra como em HOSOMI et al. (2011). Após o período de incubação, a solução de TZ foi descartada e a solução contendo as sementes foi depositada em uma lâmina de vidro de microscopia e imagem capturada em um scanner de mesa HP G2710, com uma resolução de 3600dpi. Para um melhor contraste entre as sementes coloridas, foi utilizado um fundo azul colado ao lado interno da tampa do scanner. A contagem foi feita em computador usando-se o software Adobe Photoshop® CS3. Sementes róseo-vermelhas foram consideradas vivas, enquanto as brancas, mortas.

A germinação e o TZ foram expressos em porcentagem de sementes germinadas e de sementes vivas, respectivamente.

O índice de velocidade de germinação (IVG) para cada lote de sementes testadas foi calculado como uma modificação de Maguire (1962), da seguinte forma:

$$GVI = \frac{G1}{N1} + \frac{G2}{N2} + \dots + \frac{Gn}{Nn} \text{ onde } G1, G2 \text{ e } Gn \text{ são}$$

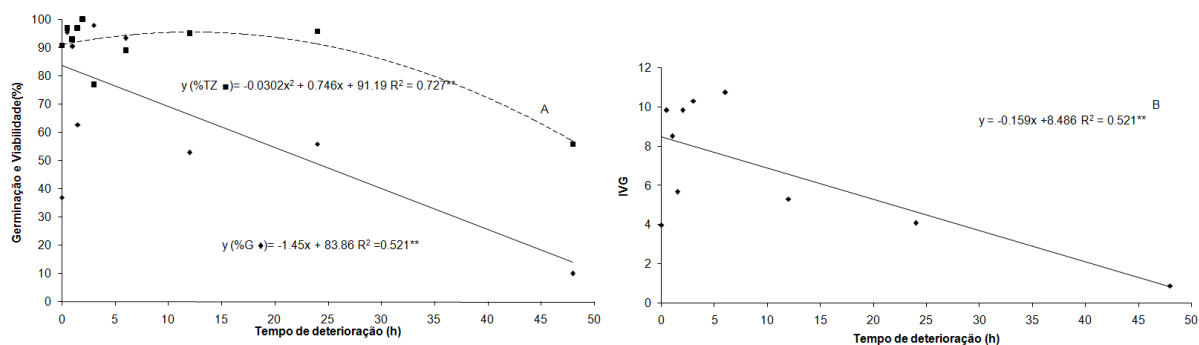


Figura 1. Germinação e viabilidade por tetrazólio, ambos em porcentagem (A) e Índice de Velocidade de Germinação (IVG - B) de sementes de *C. tigrina* submetidas a diferentes períodos de deterioração controlada à 43°C.

Na Figura 2, a germinação da *C. labiata* decresceu a partir de 24 h de exposição à deterioração, com maior intensidade em 48 h, apresentando apenas algumas sementes germinadas (Figura 2A). O tetrazólio não

as sementes germinadas em cada período de contagem de até n, que é o tempo de contagem passado. N é o número de dias após cada período de contagem (7, 14, 21 até germinação constante).

Análise estatística

A germinação e porcentagem de viabilidade foram transformadas em arco seno da raiz quadrada $\times 100^{-1}$ para normalizar a variação. O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso. Os tratamentos qualitativos foram comparados pelo teste Scott-Knott à 5% de probabilidade e as épocas de avaliação foram analisadas por regressão polinomial. Todas as análises foram feitas utilizando-se o software SISVAR® (FERREIRA, 2008).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Figura 1, a germinação da *C. tigrina* apresentou uma linha decrescente (Figura 1A). O tetrazólio por sua vez apresentou uma tendência quadrática com um máximo estimado de aproximadamente 12,4 h de tolerância à deterioração controlada (Figura 1A). O IVG desta mesma espécie apresentou tendência linear decrescente (Figura 1B).

apresentou decréscimo em relação aos tempos de deterioração estimados, representado pela equação linear (Figura 2A). O IVG apresentou tendência linear decrescente (Figura 2B).

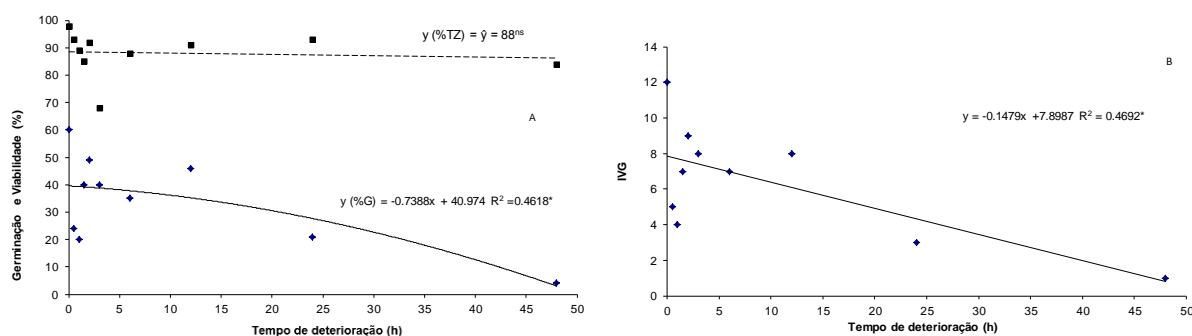


Figura 2. Germinação e viabilidade por tetrazólio, ambos em porcentagem (A) e Índice de Velocidade de Germinação (IVG - B) de sementes de *C. labiata* submetidas a diferentes períodos de deterioração controlada à 43°C.

Na Figura 3, a germinação da *C. schilleriana* apresentou decréscimo a partir de 6 h de deterioração controlada e, em 48 h foi deteriorada totalmente (Figura 3A). O tetrazólio apresentou uma linha de tendência linear

crescente, obtendo alta porcentagem até mesmo com 48 h de deterioração das sementes (Figura 3A). O IVG apresentou uma tendência quadrática decrescente (Figura 3B).

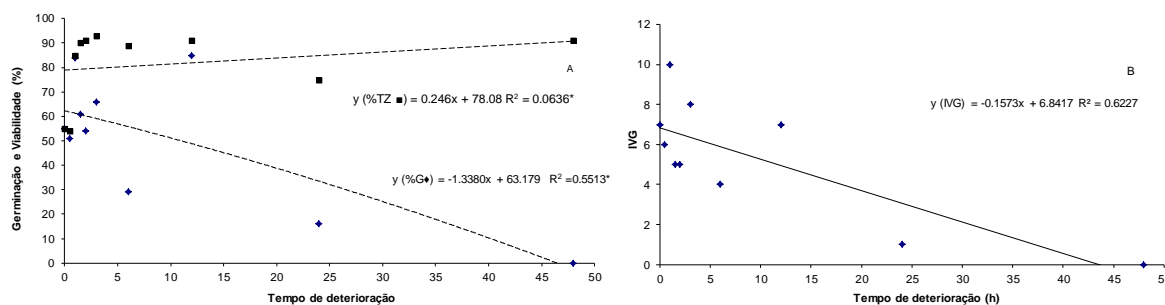


Figura 3. Germinação e viabilidade por tetrazólio, ambos em porcentagem (A) e Índice de Velocidade de Germinação (IVG - B) de sementes de *C. schilleriana* submetidas a diferentes períodos de deterioração controlada à 43°C.

Na Figura 4, a germinação e o tetrazólio da *C. crispata* apresentaram alta porcentagem, próximos a 100%, sendo representados por uma tendência quadrática com ponto de máximo em 20,41 h e o tetrazólio foi não significativo,

respectivamente (Figura 4A). O IVG apresentou uma tendência quadrática com ponto de máxima em 27,65 h (Figura 4B).

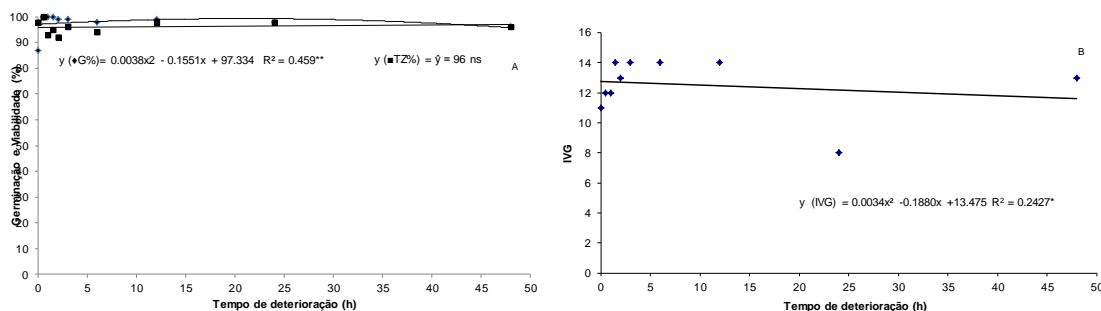


Figura 4. Germinação e viabilidade por tetrazólio, ambos em porcentagem (A) e Índice de Velocidade de Germinação (IVG - B) de sementes de *C. crispata* submetidas a diferentes períodos de deterioração controlada à 43°C.

As sementes de *C. tigrina* submetidas à deterioração controlada, apresentaram decréscimo em todos os testes realizados. As sementes de *C. labiata*, por sua vez, apresentaram decréscimo nos testes de germinação e IVG, porém, o tetrazólio não obteve resultados significativos para os diferentes graus de intensidade de deterioração controlada. A *C. schilleriana* também apresentou um decréscimo linear para os testes de germinação e IVG, em contraposição, o tetrazólio teve um aumento de acordo com o tempo maior de exposição das sementes à deterioração. Por fim, as sementes de *C. crispata* apresentaram resultados semelhantes para os testes de germinação e tetrazólio e, um decréscimo pouco significativo para o IVG.

Das sementes utilizadas neste trabalho, destacam-se as de *C. crispata* que são visivelmente maiores do que as das outras espécies trabalhadas. Esse fato pode ter sido essencial para que os resultados dessa espécie tenham sido tão altos em relação às outras, pois apresentaram dados próximos a 100% de germinação e tetrazólio, sendo pouco afetadas pela deterioração controlada. Nas demais espécies foi possível a deterioração dentro da faixa estudada, entre zero e 48 h, na temperatura de 43°C com valores calculados de 28,9, 27,7 e 23,6 h para *C. tigrina*, *C. labiata* e *C. schilleriana* respectivamente, para redução de 50% da germinação inicial.

O teste de tetrazólio não se mostrou eficiente para avaliar a deterioração controlada, uma vez que com o aquecimento houve dano celular, o que impediria o embrião de germinar, mas não houve a completa inativação das desidrogenases, permitindo a coloração das sementes após a deterioração.

Como não há nenhuma literatura relacionada com orquídeas, o tempo de exposição foi dividido em pequenos intervalos para realização do teste e posterior análise de resultados. Em sementes maiores como o maxixe (TORRES, 2005), os tempos de deterioração são mais significativos, apenas após 24 e 48 h.

CONCLUSÕES

Para sementes de *C. crispata* não foi encontrado um período adequado para o teste de deterioração controlada. Recomenda-se para as sementes de *C. tigrina*, *C. labiata* e *C. schilleriana* a utilização de 27 h a 43°C, todavia

variáveis como o tempo e a temperatura ainda precisam ser melhores estabelecidos para este grupo de plantas. O teste de tetrazólio não foi eficiente para avaliar a qualidade das sementes após a deterioração controlada.

REFERÊNCIAS

- ALVAREZ-PARDO, V.; FERREIRA, A.G. Armazenamento de sementes de orquídeas. **Revista Brasileira de Sementes**, v.28, p.92-98, 2006. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-31222006000100013>
- ARDITTI, J.; GHANI, A.K.A. Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. **New Phytologist**, v.145, p.367-421, 2000.
- ÁVILA-DIAZ, I.; OYAMA, K.; GÓMEZ-ALONSO, C.; SALGADO-GARCIGLIA, R. In vitro propagation of the endangered orchid *Laelia speciosa*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.99, p.335-343, 2009. <http://dx.doi.org/10.1007/s11240-009-9609-8>
- BRASIL. Ministério da Agricultura. **Regras para análises de sementes**. Brasília: SNAD/DNDV/CLAV, 2009. 399p.
- DRESSLER, R.L. How Many Orchids Species. **Selbyana**, v.26, p.155-158, 2005.
- DUTRA, D.; KANE, M.E.; RICHARDSON, L. Asymbiotic seed germination and in vitro seedling development of *Cyrtopodium punctatum*: a propagation protocol for an endangered Florida native orchid. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.96, p.235-243, 2009. <http://dx.doi.org/10.1007/s11240-008-9480-z>
- DUTRA, A.S.; MEDEIROS FILHO, S. Teste de deterioração controlada na determinação do vigor em sementes de algodão. **Revista Brasileira de Sementes**, Fortaleza, v. 30, n. 1, p. 19-23. 2008. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-31222008000100003>
- ELLIS, R.H.; HONG, T.D. Seed longevity - moisture content relationships in hermetic and open storage. **Seed Science & Technology**, v.35, p.423-431, 2007. <http://dx.doi.org/10.15258/sst.2007.35.2.17>
- FERREIRA, D.F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**, v.6, p.36-41, 2008.
- HOSOMI, S.T.; SANTOS, R.B.; CUSTÓDIO, C.C.; SEATON, P.T.; MARKS, T.R.; MACHADO-NETO, N.B. Pre-conditioning *Cattleya* seeds to improve the efficacy of the tetrazolium test for viability. **Seed Science & Technology**, v.139, p.178-189,

2011.
<http://dx.doi.org/10.15258/sst.2011.39.1.15>
 HOSOMI, S.T.; CUSTÓDIO, C.C.; SEATON, P.T.; MARKS, T.R.; MACHADO-NETO, N.B. Improved assessment of viability and germination of *Cattleya* (Orchidaceae) seeds following storage. In **Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v.48, p.127–136, 2012.
<http://dx.doi.org/10.1007/s11627-011-9404-1>
 IUCN. **Orchids: status survey and conservation action plan**. Los Gatos: Graphic Express, 1996.
 JUDD, W.S.; STEVENS, P.F.; KELLOGG, E.A.; DONOGHUE, M.J.; CAMPBELL, C.S. **Sistemática vegetal: um enfoque filogenético**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.
 KOOPOWITZ, H. **Orchids and their conservation**. Portland, Oregon: Timber Press, 2001.
 LEEUWEN, K.V.; SADER, R.; FESSEL, S.A.; BARBOSA, J.C. Deterioração controlada em sementes de soja armazenadas. **Revista de Ciências Agrárias**, Jaboticabal, v.33, n.1, 2005. Disponível em: <<http://www.cientifica.org.br/index.php/cientifica/article/view/69/51>>. Acesso em: 14 mar. 2012.
 LONG, B.; NIEMIERIA, A.X.; CHENG, Z.-Y.; LONG, C.-I. *In vitro* propagation of four threatened *Paphiopedilum* species (Orchidaceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.101, p.151-162, 2010. <http://dx.doi.org/10.1007/s11240-010-9672-1>
 MACHADO-NETO, N.B.; CUSTÓDIO, C.C. A medium for non-commercial sowing of orchid seed. **Selbyana**, v.26, p.316-317, 2005a.
 MACHADO-NETO, N.B.; CUSTÓDIO, C.C. Orchid conservation through seed banking: ins and outs. **Selbyana**, v.26, p.229-235, 2005b.
 MAGUIRE, J.D. Speed of germination aid in selection and evaluation of seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v.2, p.176-177, 1962. <http://dx.doi.org/10.2135/cropsci1962.0011183X000200020033x>
 MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
 NIKISHINA, T.V.; POPOV, A.S.; KOLOMEITSEVA, G.L.; GOLOVKIN, B.N. Cryopreservation of Seeds and Protocols of Rare Temperate Orchids. **Russian Journal of Plant Physiology**, v.54, p.121–127, 2007.
<http://dx.doi.org/10.1134/S1021443707010189>
 NIKISHINA, T.V.; POPOVA, E.V.; VAKHRAMEEVA, M.G.; VARLYGINA, T.I.; KOLOMEITSEVA, G.L.; BUROV, A.V.; POPOVICH, E.A.; SHIROKOV, A.I.; SHUMILOV, V.Yu.; POPOV, A.S. Cryopreservation of seeds of some tropical orchids. **Doklady Biochemistry and Biophysics**, v.378, p.231–233, 2001.
<http://dx.doi.org/10.1023/A:1011585801668>
 PRITCHARD, H.W.; POYNTER, A.L.C.; SEATON, P.T. Interspecific variation in orchid seed longevity in relation to ultra-dry storage and cryopreservation. **Lindleyana**, v.14, p.92–101, 1999.
 PRITCHARD, H.W.; SEATON, P.T. Orchid seed storage: Historical perspective, current status, and future prospects for long-term conservation. **Selbyana**, v.14, p.89-104, 1993.
 SEATON, P.T.; HAILES, N.S.J. Effect of temperature and moisture content on viability of *Cattleya aurantiaca* seed. In: PRITCHARD, H.W. (Ed.) **Modern methods in orchid conservation: the role of physiology, ecology and management**. Cambridge: University Press. 1989. p.17-29. <http://dx.doi.org/10.1017/CBO9780511551307.003>
 SEATON, P.T.; PRITCHARD H.W. Life in the freezer. **Orchids**, v.77, p.762-773, 2008.
 SHOUSHARI, B.D.; HEYDARI, R.; JOHNSON, G.L.; ARDITTI, J. Germination and viability staining of orchid seeds following prolonged storage. **Lindleyana**, v.9, p.77–84, 1994.
 SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática - guia ilustrado para identificação das Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II**. 2. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008.
 TORRES, S. B. Teste de deterioração controlada em sementes de maxixe. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 2, p. 301-310, abr-jun. 2005.

Recebido para publicação em 19/08/2015

Revisado em 18/09/2015

Aceito em 23/09/2015