

Avaliação da viabilidade de sementes de três espécies de *Cyrtopodium* (Orchidaceae) em diferentes condições de pré-condicionamento e diluições de tetrazólio.

Lima, J.H¹, Soares-Silva, L.H², Silva, G.M³

1. Aluno de doutorado em Botânica da Universidade de Brasília-DF, jhlimacoffeholic@gmail.com

2. Docente do Departamento de Botânica da Universidade de Brasília, lselena71@gmail.com

3. Aluna de graduação em Geografia da Universidade de Brasília, gabibrux@gmail.com

Resumo: Sementes de orquídea são muito diminutas e não possuem endosperma. Em razão disso, a germinação de suas sementes, para fins científicos ou comercial, é realizada *in vitro* em condições assépticas. A semeadura *in vitro* dispense quantia significativa de recursos financeiros. Assim, para evitar o uso de meio de cultura com sementes inviáveis, é recomendável avaliar a viabilidade de sementes antes da semeadura. Uma maneira de se fazer essa avaliação é por meio da embebição das sementes em solução de cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio (TTC), ou simplesmente tetrazólio. Esse sal permite avaliar, em poucas horas, a viabilidade de sementes. Entretanto, já foi verificado que a eficácia de coloração do TTC depende de características intrínsecas das sementes (impermeabilidade da testa, revestimento por substâncias graxas, etc), por isso, alguns tipos de pré-condicionamento das sementes, antes da coloração com TTC podem melhorar a eficácia do teste. Desse modo, o escopo deste trabalho foi avaliar a viabilidade de sementes de três espécies de *Cyrtopodium*: *C. parviflorum*, *C. virescens* e *C. withneri*, com o emprego de TTC. Foram avaliados dois tipos de pré-condicionamentos: embebição em solução de sacarose a 10% e em água destilada. A coloração foi testada com duas soluções: TTC a 1% diluído em água e em tampão de fosfato. Para as espécies estudadas foi verificado que o protocolo que apresentou o melhor resultado para a análise de viabilidade das sementes, foi aquele com pré-condicionamento em solução de sacarose a 10% e posterior coloração em TTC diluído em água destilada.

Palavras-chave: *Cyrtopodium*, *Orchidaceae*, pré-condicionamento, tetrazólio

Evaluation of seed viability of three species of *Cyrtopodium* (Orchidaceae) under different preconditioning conditions and tetrazolium dilutions

Abstract: Orchid seeds are very tiny and have no endosperm. For this reason, the germination of its seeds, for scientific or commercial purposes, is carried out *in vitro* under aseptic conditions. *In vitro* sowing requires a significant amount of financial resources. Thus, to avoid using culture medium with unviable seeds, it is recommended to evaluate the viability of seeds before sowing. One way to carry out this evaluation is by soaking the seeds in a 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride (TTC) solution, or simply tetrazolium. This salt allows to evaluate, in a few hours, the viability of seeds. However, it has already been verified that the effectiveness of TTC coloring depends on the intrinsic characteristics of the seeds (seed coat impermeability, coating with grease substances, etc.), so some types of pre-conditioning of the seeds, before coloring with TTC, can improve the effectiveness of the test. Thus, the scope of this work was to evaluate the viability of seeds of three species of *Cyrtopodium*: *C. parviflorum*, *C. virescens* and *C. withneri*, with the use of TTC. Two types of pre-conditioning were evaluated: soaking in a 10% sucrose solution and in distilled water. Staining was tested with two different solutions: 1% TTC diluted in water and phosphate buffer. For the species studied, it was verified that the protocol that presented the best result for the analysis of seed viability was the one with pre-conditioning in 10% sucrose solution and subsequent coloration in TTC diluted in distilled water.

Key words: *Cyrtopodium*, *Orchidaceae*, preconditioning, tetrazolium

Introdução

Orchidaceae é a segunda maior família botânica, com 27.801 espécies distribuídas em todos os continentes, exceto na Antártica (Dressler 1981; The Plant List 2013). Espécies desta família são usadas principalmente como plantas ornamentais, e em menor escala para fins medicinais e culinários (Hinsley *et al.* 2018). Em estudo realizado por Carvalho *et al.* (2013), foi verificado que Orchidaceae lidera o esforço de pesquisa em plantas ornamentais no Brasil, com 31,2% dos trabalhos publicados em Congressos de flores e plantas ornamentais. Neste estudo apurou-se que os gêneros de orquídeas nativas mais estudados foram: *Cattleya*, (56,1%), *Epidendrum* (6,1%) e *Oncidium* e *Catasetum*, ambos com 4%, não tendo sido registrado nenhum estudo para *Cyrtopodium*. Este gênero possui além de potencial farmacológico (Silva *et al.* 2013), potencial ornamental (Hunhoff *et al.* 2016), porém ainda sem produção agrícola significativa.

Em razão da ausência de endosperma e de relação micotrófica obrigatória (Dressler 1981), comercialmente as sementes de orquídeas são germinadas assimbioticamente em condições estéreis com emprego de meios de cultura compostos por nutrientes orgânicos e inorgânicos (Arditti 2008). Os custos relativos à sementeira são elevados, e por isso, a sementeira de sementes inviáveis ou de baixo vigor deve ser evitada (Stancato *et al.* 2001). O método mais difundido na avaliação da viabilidade de sementes de orquídeas é o teste de coloração com o emprego do cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio (TTC), ou simplesmente tetrazólio (Vujanovic *et al.* 2000). Este método apresenta muitas vantagens, tais como: rapidez na obtenção do resultado (menos de 20 h para a maioria das culturas), uso de equipamentos simples e baratos e facilidade na contagem das sementes viáveis (França-Neto & Krzyzanowski 2019). Apesar da eficiência do teste, o resultado pode ser afetado por inúmeros fatores, dentre eles: características intrínsecas da semente, como dureza da testa e presença de substâncias cerosas e/ou lipídicas na superfície (Custódio *et al.* 2016), que dificultam a coloração; erro no preparo da solução (Soares *et al.* 2014) ou ainda condições inadequadas de armazenamento (Hosomi *et al.* 2012). Uma maneira de tornar o teste do TTC mais eficiente é submeter as sementes a pré-condicionamentos anteriores à coloração, como embebição em solução de sacarose (Hosomi *et al.* 2017). Assim, o escopo do trabalho foi estimar a viabilidade de sementes de três espécies de *Cyrtopodium* nativas do Cerrado (*C. parviflorum* Lindl., *C. virescens* Rchb. F. & Warm. e *C. withneri* L.C. Menezes) e verificar o protocolo mais eficiente para essa avaliação.

Material e métodos

A viabilidade das sementes armazenadas foi avaliada pelo teste do tetrazólio. Foram testados dois tipos de pré-condicionamento e dois tipos de soluções de TTC. Os pré-condicionamentos consistiram em deixar as sementes em água destilada ou em solução de sacarose a 10% por 24 h em temperatura ambiente (Hosomi *et al.* 2012). Após esse período, a solução usada no pré-condicionamento foi descartada e substituída por dois tipos de solução de TTC a 1%: diluído em água destilada ou em tampão de fosfato, onde permaneceram também por 24 h no escuro e em temperatura ambiente (Soares *et al.* 2014; Hosomi *et al.* 2017). A solução de tampão de fosfato foi preparada de acordo com Souza (1994).

A contagem das sementes coradas foi feita em lâminas de vidro, e observadas em estereomicroscópio. As sementes que se encontravam no sobrenadante foram descartadas. A montagem das lâminas foi adaptada de Dutra *et al.* (2009) e Hosomi *et al.* (2017), e consistiu em adicionar ca. 165 µL de água destilada sobre a lâmina, diluir cerca de 30 µL de sementes tratadas, e cobrir com lamínula. Foi usado papel milimetrado para delimitar quatro campos de 5 x 5 mm, para contagem das sementes coradas. O sorteio dos campos foi realizado com o emprego da função “ALEATORIOENTRE” do software Microsoft Excel®. Para cada tratamento foram feitas duas repetições, e para cada repetição foram feitas duas lâminas. Cada

repetição consistiu de um microtubo de 2 mL com 20 mg de sementes. Tanto para o pré-condicionamento quanto para a coloração foram usados 1,5 mL de solução.

Foram usadas sementes dessecadas com conteúdo de umidade entre 4-6% e armazenadas entre -20 e -18 °C (Seaton & Pritchard 2001; Seaton 2007; Hosomi *et al.* 2017). O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos do CRAD/UnB (Centro de Referência em Conservação da Natureza e Recuperação de Áreas Degradadas da Universidade de Brasília-DF). As percentagens foram transformadas para valores angulares ($\arccos(x/100)$), e submetidos a análise de variância (ANOVA), e comparação das médias pelo teste Tukey a 5 % de significância, ambas no software SISVAR (Ferreira 2011).

Resultados e Discussão

Os dados obtidos mostram que o tipo de pré-condicionamento e a coloração influenciaram diretamente o resultado da viabilidade das sementes (Tabela 1). Para *C. parviflorum*, a embebição em sacarose a 10% (T3 e T4) afetou positivamente o resultado do teste, não havendo diferença no tipo de coloração. No caso de *C. virescens*, a coloração direta em TTC diluído em água sem embebição anterior (T5) produziu o maior valor de viabilidade. E por fim, foi observado que em *C. withneri* o pré-condicionamento em sacarose a 10% e coloração com TTC diluído em água (T4) foi protocolo com melhor resultado.

Tabela 1. Viabilidade de três espécies de *Cyrtopodium* estimada por meio de tetrazólio em diferentes condições de pré-condicionamento e coloração. Valores expressos em porcentagem.

Pré-condicionamento	água		sacarose 10%		-
Solução de Tetrazólio	tampão	água	tampão	água	água
Tratamento	T1	T2	T3	T4	T5
<i>Cyrtopodium parviflorum</i>	3,11 Cd	10,81 Bbc	14,10 Aab	20,06 Ca	7,76Cbc
<i>Cyrtopodium virescens</i>	15,34 Ac	44,70 Ab	13,34 Ac	45,41 Bb	87,37Aa
<i>Cyrtopodium withneri</i>	4,93 Bd	53,75 Ab	12,26 Ac	77,01 Aa	13,52Bc

Médias na mesma linha, acompanhadas de mesma letra minúscula, e médias na mesma coluna seguidas de mesma letra maiúscula, não apresentam diferença estatística pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Na literatura há bastante variação nos resultados sobre testes de viabilidade com TTC. Hosomi *et al.* (2012) verificaram que o pré-condicionamento em solução de sacarose a 10% produziu maior resposta ao teste. Já Soares *et al.* (2014) observaram que a coloração com TTC diluído em tampão de fosfatos produziu melhor resposta, mas uma das seis espécies estudadas não respondeu ao teste. Em outro trabalho, Soares *et al.* (2021) estudaram duas espécies de orquídeas do Cerrado: *Miltonia flavescens* Lindl. e *Schomburgkia crispa* Lindl. A primeira respondeu melhor ao pré-condicionamento com sacarose a 10% e incubação a 40 °C, e a outra respondeu positivamente a várias condições de pré-condicionamento e incubação. No trabalho aqui apresentado foi observado que algumas sementes apresentavam bolhas de ar em seu interior, e isso pode ter afetado negativamente o resultado de alguns tratamentos.

Apesar de ser rápido e eficiente, o teste do TTC apresenta algumas limitações, além de ser afetado por condições intrínsecas da própria semente e por tratamentos pelos quais as sementes foram submetidas (França-Neto & Krzyzanowski 2019).

Referências

Arditti, J. 2008. Micropropagation of orchids. 2^a ed. Blackwell publishing, Malden. vol. 1. Pp. 1-138.

- Carvalho, A.C.P.P.; Tombolato, A.F.C.; Rodrigues, A.A.J.; Santos, E.O.; Silva, F. 2013. Micropropagação de orquídeas. Pp. 13-53. In: T.G. Junghans & A.S. Souza (eds.). Aspectos Práticos da Micropropagação de Plantas. 2 ed. Brasília: EMBRAPA.
- Custódio, C.C.; Marks, T.R.; Pritchard, H.W.; Hosomi, S.T.; Machado-Neto, N.B. 2016. Improved tetrazolium viability testing in orchid seeds with a thick carapace (*Dactylorhiza fuchsii*) or dark seed coat (*Vanda curvifolia*). Seed Sci. & Technol., 44, 1, 1-12. <http://doi.org/10.15258/sst.2016.44.1.17>
- Dressler, R.L. 1981. The orchids: natural history and classification. Cambridge: Harvard University Press. 331 pp.
- Dutra, D.; Kane, M.E.; Richardson, L. 2009. 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 96: 235-243.
- Ferreira, D.F. 2011. SISVAR: a computer statistical analysis system. Ciência e Agrotecnologia 35(6):1039-1042.
- França-Neto, J.B.; Krzyzanowski, F.C. (2019). Tetrazolium: an important test for physiological seed quality evaluation. Journal of Seed Science, v.41, n.3, p.359-366. <http://dx.doi.org/10.1590/2317-1545v41n3223104>
- Hinsley, A.; Boer, H.J.; Fay, M.F.; Gale, S.W.; Gardiner, L.M.; Gunasekara, R.S.; Kumar, P.; Masters, S.; Metusala, D.; Roberts, D.L.; Veldman, S.; Wong, S.; Phelps, J. 2018. A review of the trade in orchids and its implications for conservation. Botanical Journal of the Linnean Society 186: 435-455
- Hosomi, S.T.; Custódio, C.C.; Seaton, P.T.; Marks, T.R.; Machado-Neto, N.B. 2012. Improved assessment of viability and germination of *Cattleya* (Orchidaceae) seeds following storage. In Vitro Cellular & Developmental Biology -Plant 48:127-136.
- Hosomi, S.T.; Souza, T.B.; Custódio, C.C.; Neto, N.B.M. 2017. Refining the tetrazolium test for evaluation of *Cattleya labiata* and *C. tigrina* seeds viability. Australian Journal of Crop Science. [http://doi: 10.21475/ajcs.17.11.10.pne606](http://doi:10.21475/ajcs.17.11.10.pne606)
- Hunhoff, V.L.; Silva, C.A.; Lage, L.A.; Krause, W.; Palú, E.G. 2016. Biologia, morfologia floral e potencial ornamental de *Cyrtopodium saintlegerianum* (Orchidaceae). Agro@ambiente 10(4): 358-363.
- Seaton, P.T. 2007. Establishing a Global Network of orchid seed banks. Lankesteriana 7(1-2): 371-375.
- Seaton, P.T.; Pritchard, H.W. 2001. Orchid seed stores for sustainable use: a model for future seedbanking activities. Lankesteriana 11(3): 349-353.
- Silva, A.G.; Boldrini, R.F.; Kuster, R.M. 2013. Os sumarés cicatrizantes da medicina tradicional brasileira, ou, as surpresas químicas ativas do desconhecido gênero *Cyrtopodium* (Orchidaceae). Natureza on line 11(3): 152-154.
- Soares, J.S.; Rosa, Y.B.C.J.; Tatará, M.B.; Sorgato, J.C.; Lemes, C.S.R. 2014. Orchid seeds viability identification by tetrazolium test. Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 35, n. 5, p. 2275-2284. [http://DOI: 10.5433/1679-0359.2014v35n5p2275](http://DOI:10.5433/1679-0359.2014v35n5p2275)
- Souza, F.H.D. 1994. Preparation of neutral solutions of tetrazolium. Comunicado Técnico Embrapa, n.51. Available at: <http://old.cnpqg.embrapa.br/publicacoes/cot/COT51.html> Accessed at January 21st, 2020.
- Stancato, G.C.; Abreu, M.F.; Furlani, A.M.C. 2001. Produção de mudas de orquídeas a partir de sementes in vitro e sua viabilidade econômica: estudo de caso. Revista Brasileira de Horticultura Ornamental 17(1): 25-33.
- Vujanovic, V.; St-Arnaud, M.; Barabé, D.; Thibeault, G. (2000). Viability Testing of Orchid Seed and the Promotion of Colouration and Germination. Annals of Botany 86: 79-86. <http://doi:10.1006/anbo.2000.1162>