

Bancos de germoplasma: estratégias para a conservação de orquídeas e outras epífitas nativas do Paraná

Áreas do conhecimento:

2.00.00.00-6 - ciências biológicas

2.03.00.00-0 – botânica

2.03.03.02-5 - reprodução vegetal

Breve histórico da instituição:

A UEM foi fundada na década de 60, sendo o curso de graduação em Ciências Biológicas um dos primeiros a se consolidar. Atualmente a UEM é considerada a primeira universidade paranaense, e a 31º lugar no Ranking Iberoamericano SIR, tendo em vista sua alta capacidade de produção científica. Desde 1995, nela encontra-se instalado no Museu Dinâmico Interdisciplinar da UEM (Mudi), atualmente o segundo maior museu de ciências da região Sul do Brasil, e o maior museu de ciências do estado do Paraná, tanto em área de exposição quanto em número de visitantes. Neste museu de ciências está o laboratório de cultivo de orquídeas e bromélias, contando com bons equipamentos e onde são desenvolvidos ensaios para dissertações e teses de programas de pós-graduação em agronomia (PGA) e Biologia Comparada (PGB) da UEM, além de projetos de iniciação científicas diversos (PIC e PIBIC). Acadêmicos dos cursos de biologia e agronomia, após capacitações, recebem os visitantes deste museu, repassando os resultados obtidos com as pesquisas realizadas no local.

RESUMO

A sociedade necessita unir-se pela preservação ambiental. O apoio de entidades e representantes da sociedade civil, engajados nos estudos de preservação e sustentabilidade ambientais, é fundamental para que essa união seja vitoriosa, pois é por meio delas que os estudos se desenvolvem e aprofundam, trazendo conhecimentos importantes para todos nós. Projetos que prevêm a conservação de espécies nativas devem ser executados com a máxima urgência, evitando-se assim a erosão genética na biodiversidade brasileira. Dentre as técnicas mais atuais de conservação da flora destacam-se os bancos de germoplasmas *in vitro* e em nitrogênio líquido, ambos pouco dispendiosos para as instituições mantenedoras e com garantia de produção de milhares de mudas, assim que se fizerem necessárias nos projetos de repovoamento de áreas

nativas. Este estudo terá como objetivo coletar sementes de orquídeas, bromélias, Cactáceas, Piperáceas e outras angiospermas epífitas nativas nas áreas da floresta atlântica do litoral do Paraná, e propor métodos de manutenção das mesmas em bancos germoplasma *in vitro* (sobre meio de cultura) e em nitrogênio líquido (criopreservação) por muitos anos, devendo serem retiradas amostras, periodicamente, para semeadura e produção de novas mudas. Os métodos de manutenção das culturas de orquídeas e bromélias *in vitro* já estão relativamente bem estabelecidos para algumas espécies de valor comercial, enquanto que para as demais pouco (ou nada) sabemos. Por sua vez, a manutenção das pequenas sementes das epífitas em nitrogênio líquido ainda necessita de estudos mais aprofundados, mesmo para as espécies de orquídeas mais conhecidas. Estudos prévios realizados nos laboratórios do Departamento de Biologia e no Museu Dinâmico da UEM (MUDI, www.pec.uem.br/mudi), com sementes de epífitas nativas do noroeste e centro do Paraná tem revelado que a manutenção de ambos os tipos de banco de germoplasma podem fornecer dados imprescindíveis para a conservação de epífitas nativas, contribuindo para ações efetivas de produção de mudas em larga escala. A cada seis meses, lotes de plântulas *in vitro* ou sementes criopreservadas serão retiradas para análises dos parâmetros morfométricos usuais, e seguirão para viveiros para aclimatização das mudas, e posteriormente serem recolocadas em seus respectivos ambientes naturais. Em adição, nas ações extensionistas realizadas no Museu Dinâmico, ao receber diariamente dezenas de visitantes, a maioria em idade escolar, tem-se uma oportunidade única de repassar à comunidade, através de visitas monitoradas, todas as informações acerca dos métodos de preservação das espécies nativas acima citadas, contribuindo com a educação ambiental e consolidando positivamente a imagem das instituições que apóiam as pesquisas, básicas e aplicadas, junto à comunidade científica e leiga.

Palavras-chaves: germoplasma, epífitas, conservação, educação ambiental.

OBJETIVO GERAL

Este projeto prevê a consolidação de metodologias efetivas para a criação e manutenção de bancos de gemoplasma *in vitro* e em nitrogênio líquido (criopreservação) de espécies de orquídeas e outras epífitas nativas do estado do Paraná, e o repasse destes conhecimentos à comunidade em geral.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Coleta lotes de sementes de orquídeas e outra epífitas nativas do Paraná.
- Adequar das salas temáticas de atendimento ao público visitante do MUDI (educação ambiental).
- Elaborar e publicar trabalhos científicos nas áreas de coleções de flora em bancos de germoplasma.
- Esclarecer à população do compromisso e da preocupação das instituições e pessoas envolvidas neste projeto em relação às ações efetivas para a preservação ambiental.

INTRODUÇÃO

O estado do Paraná, atualmente conta com números inferiores a 5% de suas exuberantes florestas nativas (Soares-Silva et al., 1992), com destaque para a Floresta Estacional Semidecidual, que ocupavam a maior parte do norte e noroeste do estado, a Floresta Estacional Semidecidual com Araucárias, originalmente ocorrente nas regiões centro e sul do Paraná, e a Floresta Ombrófila Densa, localizada sob influência atlântica. Sob os domínios dessa está a Área de Preservação Permanente de Guaratuba (APA de Guaratuba), abrangendo a Microrregião de Paranaguá. Segundo o mapeamento da Floresta Atlântica realizado pela SEMA/PRÓ-ATLÂNTICA (2002), a extensão da Floresta Ombrófila Densa é bastante expressiva, destacando-se a Formação Sub-Montana (com 64.756 ha), seguida pela Formação Montana (com 41.070 ha) e Alto Montana (com 1.309 ha). A cobertura conservada da Floresta Ombrófila Densa Aluvial é bastante significativa (65,6 %, ou 5.112 ha).

Por toda a floresta atlântica brasileira observa-se a abundância de espécies de hábito epifítico. Entende-se por plantas epífitas aquelas que se utilizam de outras espécies como substrato para seu desenvolvimento, com ausência da relação interespecífica denominada parasitismo. Essas plantas são divididas em dois grandes grupos: holoepífitas, encontradas sempre ou quase sempre na condição epifítica, sem nenhum contato com o solo; e hemiepífitas, que apresentam contato com o solo em pelo menos uma fase de seu ciclo de vida.

As espécies epífitas compõem um dos importantes grupos florístico das florestas tropicais por apresentarem alto grau de endemismo (com dispersão restrita a áreas de pequenas dimensões) e frequente especificidade de microambientes, sendo diretamente

influenciadas pelo clima e nível de distúrbio antrópico (Benzing, 1990). Segundo Kress (1986), aproximadamente 10% de todas as plantas vasculares são epífita, sendo encontradas quase exclusivamente em florestas tropicais, estando distribuídas em 84 famílias, chegando a representar mais de 25% das espécies de muitos países. São portanto, responsáveis por grande parte da diversidade as florestas tropicais.

A importância ecológica do epifitismo, nas comunidades florestais, consiste na manutenção da diversidade biológica e no equilíbrio interativo dentre as espécies, visto que proporcionam recursos alimentares (frutos, néctar, pólen, água) e microambientes especializados para a fauna do dossel, constituída por uma infinidade de animais voadores, arborícolas e escansoriais (que vivem tanto no estrato arbóreo quanto no chão) (Waechter, 1992). Em adição, as aves também podem utilizar vários recursos das epífitas, tais como frutos, flores, sementes, água (reservada entre as folhas), invertebrados que nelas vivem e que lhes servem de alimento, além de material e local para nidificação (Coelho et al., 2002).

Os recursos genéticos vegetais são reservatórios naturais de genes com potencial de uso para a produção sustentável de gêneros essenciais à humanidade, tais como alimentos, fibras e medicamentos, ou pelo simples fato de comporem uma floresta nativa. Entretanto, essa biodiversidade está sendo destruída numa velocidade alarmante, devido ao crescimento desorganizado e à exploração sem controle dos ecossistemas. Vários métodos de conservação *in situ* e *ex situ* do germoplasma de raças locais, cultivares domésticas e parentes silvestres de espécies agrônômicas já foram propostos como medida de prevenção desse processo de erosão genética (Bajaj, 1995), mas pouco sabemos das espécies nativas do Brasil.

A possibilidade de obter plantas inteiras a partir de células isoladas, pequenos pedaços de tecidos ou órgãos vegetais e plântulas advindas de sementes, pelo uso de técnicas de cultura de tecidos levou ao estabelecimento dos bancos de germoplasma *in vitro*. Este tipo de banco envolve a manutenção de culturas em crescimento ativo através de subculturas periódicas das brotações laterais e segmentos nodais (caulinares), conforme salientou Santos (2001). No caso das orquídeas, cujas sementes são produzidas aos milhares em cada fruto, raramente ultrapassam 0,5mm de comprimento, mas apenas germinam na presença de fungos micorrízicos, ou sob condições laboratoriais, na presença de formulações nutritivas contendo sais minerais e sacarose. A preservação de genótipos sob cultura *in vitro* é reconhecida como um método de fácil aplicação e baixos custos operacionais.

Outro método de preservação de germoplasma é a criopreservação, definida como a conservação de material biológico em nitrogênio líquido a -196°C , ou em sua fase de vapor, a -150°C . Essa técnica pode assegurar a conservação de material biológico por longos períodos de tempo, uma vez que sob temperatura ultra baixa o metabolismo celular fica tão reduzido que a deterioração biológica é virtualmente paralisada. As técnicas de criopreservação desenvolvidas mais recentemente são relativamente simples e estão baseadas na vitrificação dos tecidos vegetais. Neste processo (ou formação do estado vítreo) a água sofre uma transição da fase líquida para um estado sólido amorfo e meta-estável (Fahy et al., 1984). O sólido assim formado é, na verdade, uma solução super-saturada e de alta viscosidade, o que lhe confere as propriedades mecânicas de um sólido, embora não haja formação de uma estrutura cristalina, capaz de perfurar e destruir os sistemas de membranas celulares. A transição para o estado vítreo não envolve mudanças químicas, mas apenas mudanças físicas na viscosidade do líquido. No caso específico das pequenas sementes de orquídeas, existem propostas divergentes quanto à metodologia a ser empregada no momento da criação do banco de germoplasma sob nitrogênio líquido, tendo alguns autores afirmado a real necessidade do processo de verificação dos tecidos, enquanto que outros afirmam que a simples imersão em nitrogênio líquido mostra-se suficiente para manter a viabilidade das mesmas, como relatado por Pritchard (1984) para 10 espécie de orquídeas, mas amplas variações de resultados podem ocorrer, dependendo da espécie e mesmo do lote de sementes utilizado. Atualmente a aplicação da solução de verificação proposta por Sakai et al. (1990) tem revelado-se como o método mais adequado para várias espécies da flora em geral.

Em adição às técnicas de preservação ambiental, em teoria, todas as espécies podem ser conservadas *ex situ*, desde que possam ser periodicamente multiplicadas. Tradicionalmente conservaram-se *ex situ* recursos importantes para o homem como as espécies úteis na alimentação e agricultura, cuja conservação exige segurança e disponibilidade imediatas e futuras. Entretanto, com as constantes perdas dos ambientes naturais, a manutenção de bancos de germoplasma de espécies nativas torna-se uma técnica muito importante e útil para a reestruturação das comunidades vegetais junto aos projetos de reestruturação ambiental.

Toda esta preocupação com a preservação é justificada pelo perigo de extinção sob a qual as espécies se encontram. O nível de ameaça pode ser determinado consultando a lista vermelha de espécies em perigo de extinção (Red List Categories) da

The World Conservation Union (IUCN). Quanto às espécies de orquídeas, bromélias, Piperáceas e outras epífitas paranaenses, pouco sabemos a respeito de suas estratégias reprodutivas, e menos ainda das especificidades de suas sementes para serem conservadas por longo período de tempo. Desta forma, a conservação dos recursos fitogenéticos é um trabalho contínuo, a longo prazo, que implica investimentos importantes em tempo, pessoal, instalações e operacionalidade, justificáveis em função das necessidades, e não do desejo ou conveniência de se conservar espécies da extinção.

Atualmente o laboratório de cultivo de orquídeas e bromélias do Museu Dinâmico Interdisciplinar da UEM já conta com um banco de germoplasma *in vitro*, com mais de 40 espécies de orquídeas nativas da região central do estado do Paraná, no qual estão sendo definidas as especificidades de cada espécie quanto à composição do meio de cultura. Este projeto em muito possibilitou o aprimoramento das técnicas de semeadura e manutenção deste banco de germoplasma. Entretanto, os métodos de criopreservação ainda necessitam de pesquisas aprofundadas para que se tornem padronizados e proporcionem condições seguras para a manutenção da viabilidade das sementes mantidas sob esta condição.

Em adição, tendo em vista que o Museu Dinâmico Interdisciplinar da UEM (MUDI) conta com ambientes temáticos para a educação informal, repassando à comunidade os conhecimentos acadêmicos nas áreas das ciências ambientais, anatomia humana, química, física e inclusão digital. Todas as técnicas de conservação da biodiversidade propostas neste estudo serão repassadas para a comunidade visitante do MUDI, contribuindo para incrementar a conscientização ambiental e a importância de se manter o patrimônio genético das populações vegetais de nosso estado.

MATERIAIS E MÉTODOS

Este projeto será desenvolvido na área de abrangência da APA de Guaratuba, e nos laboratórios temáticos de cultivo de orquídeas e bromélias do Museu Dinâmico Interdisciplinar (Bloco O-33) da UEM.

Na fase inicial deste projeto serão adquiridos reagentes e equipamentos necessários para adequação dos laboratórios do Mudi, prevendo-se a implantação do banco de germoplasma *in vitro* e sob criopreservação (em nitrogênio líquido).

A seguir serão realizadas expedições à APA de Guaratuba, com intervalos de 50-60 dias, para coletas frutos maduros das epífitas, marcação (por georeferenciamento) ou coleta de matrizes com frutos imaturos (as quais serão posteriormente devolvidas aos

respectivos locais de origem. As sementes que coletadas no ano de 2013 e primeiro semestre de 2014 serão subdivididas em lotes, acondicionadas em criotubos (2mL) e submersas diretamente em nitrogênio líquido, ou então, submetidas ao processo de vitrificação segundo Sakai et al. (1990) por 1 hora (Carvalho, 2006) e imediatamente depositadas em galões de nitrogênio líquido. Salienta-se que o departamento de Física da UEM e o COMCAP (Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa, vinculado à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação) da UEM disponibilizam o nitrogênio líquido aos demais departamentos, o que facilita a manutenção deste tipo de coleção biológica.

Para se manter o fluxo gênico nas populações nativas, devem ser mantidos nos bancos de germoplasma diversos “acessos” (amostras de uma mesma espécie), e sua análise indicará se as metodologias são aplicáveis ou não às espécies com amplas variações genotípicas, como é o caso das orquídeas brasileiras.

Em adição, cada lote de semente coletado também será subdividido em pequenas porções, desinfectado superficialmente com etanol 70% por 1 minuto, lavado com água esterilizada em abundância, novamente desinfectado pela ação do hipoclorito de sódio a 15% (solução comercial), lavado com água em abundância e inoculado sobre meio de cultura “C” de Knudson (nitrato de cálcio (1g), sulfato de amônio (0,5g), fostato monobásico de potássio (0,25g), sulfato de magnésio (0,25g), sulfato ferroso (0,025g) e sulfato de manganês (0,0075g), além de 20g de sacarose e 3-5g de ágar (agente geleificante), suplementado com água de coco (100 mL/L) ou polpa de banana “nanica” (90g/L) (pH mantido entre 4,8 a 5,5), conforme as indicações de Arditti et al. (1982) para orquídeas tropicais. Este mesmo meio de cultura mostra-se também adequado para a germinação de outras espécies epífitas, como bromélias e cactos.

Antes de seguirem para os bancos de germoplasma, todos os lotes de sementes serão submetidos ao teste de viabilidade com cloreto de 2,3,5 trifenil-tetrazólio estabelecido pela “International Seed Testing Association” (ISTA, 1993), e analisadas ao microscópio óptico (no caso das orquídeas) ou sob estereomicroscópio (para demais espécies com sementes maiores), quanto à porcentagem de embriões coradas em vermelho vivo (viáveis), cinza (não viáveis) ou sem embrião. Caso as porcentagem das últimas 2 classes citadas sejam superior a 95%, o lote de sementes deverá ser descartado.

Para a análise do banco de germoplasma em nitrogênio líquido, semestralmente, lotes de sementes serão descongelados em banho-maria e novamente analisados quanto à viabilidade de seus embriões. Aqueles lotes que se mantiverem viáveis serão

semeadas em placas de Petri com papel de filtro umedecidos com água destilada, ou sobre meios de cultura específicos para orquídeas, bromélias e Cactos, conforme especificado acima, culminando na produção de centenas de mudas. Essas serão encaminhadas às estufas agrícolas do Departamento de Biologia e posteriormente aos seus locais de origem, em futuros projetos de aclimatização e recolocação de espécies nativas em áreas de florestas nativas.

Os ensaios científicos acima citados serão mantidos sob condições de iluminação e temperatura controladas no laboratório de cultivo de orquídeas e bromélias do MUDI, sob temperatura de $25\pm 3^{\circ}\text{C}$ e iluminação controladas por lâmpadas fluorescentes de 40W, tipo luz do dia.

Todos os procedimentos e trabalhos científicos acima realizados serão utilizados para a elaboração de pequenas palestras a serem apresentadas aos visitantes do MUDI, e proferidas pelos graduandos deste projeto (que atuarão como monitores neste museu). Estes acadêmicos utilizarão os dados científicos acima obtidos para a elaboração de textos e apresentações com figuras, de modo a expor aos visitantes os métodos que estão sendo utilizados para a preservação das espécies epífitas deste projeto, auxiliando, de modo informal, com a educação ambiental.

Resultados esperados

Espera-se com a execução deste projeto a consolidação de metodologias facilmente aplicáveis para a manutenção de coleções de sementes viáveis (em nitrogênio líquido) e plântulas sob condições assépticas (*in vitro*) por muitos anos. Assim, dezenas de espécies de epífitas paranaenses poderão, a qualquer momento, serem propagadas e servirem para os projetos de repovoamento de áreas florestadas, e onde ocorriam naturalmente.

Plano de divulgação

Os resultados desta pesquisa serão divulgados em congressos e encontros científicos nas áreas de botânica e ecologia, assim como em revistas científicas nas áreas de botânica e conservação da biodiversidade.

Diariamente, os resultados obtidos serão divulgados para a comunidade acadêmica e leiga (grande parte composta por estudantes do ensino fundamental e médio) na sala temática da botânica, no Museu Dinâmico Interdisciplinar (Mudi/UEM).

interfaces

Atualmente encontra-se em fase final de elaboração um banco de germoplasmas *in vitro*, com mais de 60 acessos de sementes de orquídeas obtidas na área de supressão da vegetação da Usina Hidrelétrica Mauá (Telêmaco Borba e Ortigueira), além de em banco de germoplasma em nitrogênio líquido com 10 espécies, como as anteriores, pertencentes a um projeto de pesquisa sob convênio com a Eletrosul Centrais Elétricas S.A., o qual serviu como experiências e treinamento da equipe, para a implantação das metodologias aplicadas no laboratório do Museu Dinâmico da UEM.

Espera-se para os próximos anos a continuidade deste projeto, com a produção de centenas de mudas aclimatizadas, para serem replantadas em seus respectivos locais de origem da Floresta Atlântica.

Referências Bibliográficas

ARDITTI, J.; CLEMENTS, G.; FAST, G.; HADLEY, G.; NISHIMURA, G.; ERNST, R. 1982. Orchid seed germination and seedling culture - A manual. *In*: Arditti, J. (ed.) **Orchid biology: reviews and perspectives II**. New York, Cornell University Press. p. 244-370.

BAJAJ, Y.P.S. Cryopreservation of plant cell, tissue, and organ culture for the conservation of germplasm and biodiversity. *In* BAJAJ YP.S. (ed.). **Cryopreservation of plant germplasm I**. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp 3-28, 1995.

BENZING, D.H. **Vascular epiphytes**. Cambridge Cambridge University Press. 1990.

BONNET, A.; CURCIO, G.R.; LAVORANTI, O.J.; GALVÃO, F. Relações de epífitos vasculares com fatores ambientais nas florestas do Rio Tibagi, Paraná, Brasil. **Biotemas**, v. 23, n. 3, p. 37-47, 2010.

BONNET, A.; CURCIO, G.R.; GALVÃO, F. Epifíticas vasculares e suas relações com fatores ambientais no rio Tibagi, Paraná, Brasil. **Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil**, Caxambu – MG, 2007.

BONNET, A.; CURCIO, G.R.; GALVÃO, F.; KOZERA, C. Diversidade e distribuição espacial de bromeliáceas epifíticas do altíssimo rio Tibagi – Paraná – Brasil. **Floresta**, v.40, n.1, p. 71-80, 2010.

BORGIO, M.; SILVA, S.M. Epífitos vasculares em fragmentos de Floresta Ombrófila Mista, Curitiba, Paraná, Brasil. **Rev. Brasil. Bot.**, v.26, n.3, p.391-401, 2003.

CARVALHO, V. S. **Criopreservação de sementes e pólen de orquídeas**. 2006. 82f. Tese (Doutorado em Fitotecnia)- Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2006.

COELHO, C.P.; PINHEIRO, T.F.; LAPS, R.R. Epífitas como fonte de recursos para aves na Serra do Teimoso, Jussari, Bahia. *In*: Santos, F.A.M.; Alves, T.F. (Orgs.). **Tópicos em Ecologia de Campo II** (Pesquisa em Dossel) do Programa de Pós-graduação em Ecologia, IB, UNICAMP. 2002.

DIAS, M. C.; VIEIRA, A.O.S.; NAKAJIMA, J.N.; PIMENTA, J.A.; LOBO, P.C. Composição florística e fitossociologia do componente arbóreo das florestas ciliares do rio Iapó, na bacia do rio Tibagi, Tibagi, PR. **Rev. Bras. Bot.**, v. 21, n. 2, 1998.

GAIOTTO, D.F.; ACRA, L.A. Levantamento qualitativo de epífitos da fazenda Gralha Azul – Fazenda Rio Grande – Paraná. **Rev. Estud. Biol.**, v. 27, n. 60, p. 25-32, 2005.

SAKAI, A.; KOBAYASHI, S.; OIYAMA, L. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. Var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. **Plan Cell Report**, v. 9, p. 30-33, 1990.

SEMA/PRÓ-ATLÂNTICA. **Mapeamento de Vegetação - digital**. Curitiba, 2002. Escala 1:50 000.