



## CRESCIMENTO *IN VITRO* DE *Catasetum x apolloi* BENELLI & GRADE (ORCHIDACEAE) EM MEIO DE CULTURA COM ADIÇÃO DE LICOR PIROLENHOSO DE TECA (*Tectona grandis*)

Daniel Pereira Miranda<sup>1</sup>; Aleson Vieira<sup>2</sup>; Isane Vera Karsburg<sup>3</sup>

1. Graduando em Agronomia da Universidade do Estado de Mato Grosso, *Campus* de Alta Floresta - MT, Brasil.  
(danielmiranda08@hotmail.com)
2. Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas pela Universidade do Estado de Mato Grosso, *Campus* de Alta Floresta - MT, Brasil.
3. Professora Doutora da Universidade do Estado de Mato Grosso, *Campus* de Alta Floresta - MT, Brasil.

Recebido em: 12/04/2014 – Aprovado em: 27/05/2014 – Publicado em: 01/07/2014

### RESUMO

A espécie *Catasetum x apolloi* é um híbrido natural resultante do cruzamento entre *Catasetum schmidtianum* e *Catasetum longifolium*. A cultura *in vitro* é vista como uma ótima alternativa para propagação de orquídeas, a adição de outros elementos nestes meios de cultura podem aumentar essa eficiência como o extrato pirolenhoso, proveniente da condensação da fumaça da queima da madeira. O trabalho objetivou avaliar a eficiência do extrato pirolenhoso de teca no desenvolvimento *in vitro* de *Catasetum x apolloi*. Foi utilizado o meio de cultura alternativo: 30g L<sup>-1</sup> de sacarose, 4g L<sup>-1</sup> de carvão ativado, 2g L<sup>-1</sup> de fertilizante B&G, 100 mL L<sup>-1</sup> de água de coco. O meio de cultura foi autoclavado e cada frasco recebeu 5 protocormos. Foram avaliadas 20 plantas por tratamento (0, 1, 2, 3, 4 e 5 mL L<sup>-1</sup> de licor pirolenhoso). Não houve diferença estatística entre os tratamentos nas variáveis: número de raízes, comprimento da maior raiz e comprimento médio de raízes. Para o número de folhas por planta o tratamento com 3 mL L<sup>-1</sup> obteve o menor valor. As variáveis comprimento: total de folhas, comprimento da maior folha e tamanho total de plantas obtiveram semelhança, já que com a adição do extrato pirolenhoso o ponto mínimo ficou entre 2,7 e 2,8 mL L<sup>-1</sup>. Para o peso de massa fresca, as maiores médias estão nos tratamentos com 0 e 5 mL L<sup>-1</sup>. Os melhores tratamentos foram 0 e 5 mL L<sup>-1</sup>, porém é preferível a não utilização do extrato pirolenhoso, já que não houve diferença significativa entre os dois.

**PALAVRAS-CHAVE:** Fumaça, Híbrido, micropropagação, madeira

### *In vitro* GROWTH OF *Catasetum x apolloi* Benelli & GRADE (ORCHIDACEAE) IN CULTURE MEDIUM WITH ADDED PYROLIGNOUS TEAK (*Tectona grandis*)

### ABSTRACT

The *Catasetum x apolloi* species is a natural hybrid resulting from the crossing of *Catasetum schmidtianum* and *Catasetum longifolium*. *In vitro* culture is seen as a great alternative for orchid propagation, the addition of other elements in these culture media can increase this efficiency as pirolenhoso extract, derived from the condensation of smoke from burning wood. The study aimed to evaluate the

efficiency of pirolenhoso extract teak in vitro development of *Catasetum x apolloi*. Alternative culture medium was used: 30 g L<sup>-1</sup> sucrose, 4 g L<sup>-1</sup> activated charcoal, 2 g L<sup>-1</sup> of fertilizer B & G®, 100 mL L<sup>-1</sup> coconut water. The culture medium was autoclaved and each vial received 5 protocorms. 20 plants were evaluated per treatment (0, 1, 2, 3, 4 e 5 mL L<sup>-1</sup> of pirolenhoso extract). There was no statistical difference between treatments in the variables number of roots, length of roots and average root length. For the number of leaves per plant treatment with 3 mL L<sup>-1</sup> had the lowest value. The total length of variables leaves, leaf length of the largest overall size and plant obtained similarity, as with the addition of the minimum point pyroligneous extract was between 2.7 and 2.8 mL L<sup>-1</sup> to the weight of fresh weight, are the best means for treatments with 0 and 5 mL L<sup>-1</sup>. For shoot growth the best treatment was to 0 mL L<sup>-1</sup> and the root growth can add any dose of liquor pirolenhoso.

**KEYWORDS:** Hybrid, micropropagation, wood, smoke

## INTRODUÇÃO

A família das orquídeas é provavelmente a maior do reino vegetal, com mais de 750 gêneros com pelo menos 25.000 espécies nativas e mais de 30.000 híbridos e mais estão sendo adicionados à lista crescente de híbridos (HEW & YONG, 2004). Sua maior localização se encontra em regiões mais quentes, ou seja, nos trópicos e é nessa região onde há o maior número de exemplares, tanto em número quanto em variedades de formas (SUTTLEWORTH ET AL., 1994).

O gênero *Catasetum* em sua grande maioria são constituídas de plantas epífitas, ocasionalmente terrestres, é compreendida por centenas de espécies, são encontradas na América- tropical. Sua flores são grandes e vistosas, algumas com bela aparência, outras são grotescas. Algumas são decíduas e outras mantêm as folhas até que os botões surjam (KRAMER, 1989).

Descrito em 2008 como uma nova espécie da região de Mato Grosso, o *Catasetum apolloi* é, comprovadamente um híbrido natural do cruzamento de *C. schmidtianum* e *C. longifolium*. No entanto, as observações iniciais não foram conclusivas, o que levou a realização de experimentos de hibridação conduzida, visando obter um resultado que confirmasse a condição de híbrido natural (PETINI-BENELLI & GRADE, 2012).

Segundo UNEMOTO et al., (2007) a técnica da cultura de tecidos tem auxiliado na preservação das espécies de orquídeas, esta possui várias vantagens e uma delas é o manuseio de um grande número de indivíduos em um espaço reduzido e sob condições assépticas. KLEIN (2008) afirma que a micropropagação é realizado pelos processos de cultura de meristemas e sementeiras, onde na cultura de meristemas de uma orquídea, consiste na retirada de um explante, colocado em meio de cultura sintético para que este se multiplique e de origem a outras plantas, clones da mesma. Na sementeira duas plantas são fecundadas ou uma ótima planta autofecundada, aumentando a variabilidade genética, sendo assim, suas sementes utilizadas para micropropagação.

Para GUIRRA (2003) citado por SCHNITZER (2009) o licor pirolenhoso é um subproduto orgânico resultante da queima de madeira ou bambu, proveniente a condensação da fumaça expelida e coletado entre 80° a 120° C. Pode ser utilizado também na agricultura, no controle de pragas e na adubação (GLASS, 2004). O licor pirolenhoso pode proporcionar benefícios as plantas tratadas *in vitro* por ser composto de água em sua maior parte e mais de 200 compostos orgânicos, entre

eles estão o ácido acético, fenóis, cetonas, álcoois e alguns derivados de lignina (MAEKAWA, 2002 citado por ALVES, 2006).

Objetivou-se com o trabalho, avaliar o crescimento de protocormos de *Catasetum x apolloi* em meio de cultura alternativo com diferentes concentrações do licor pirolenhoso de teca afim de estabelecer a melhor concentração para a propagação da espécie.

## MATERIAL E METODOS

O experimento foi conduzido no laboratório de Citogenética e Cultura de Tecidos Vegetais da Universidade do Estado de Mato Grosso de Alta Floresta – MT. Foram utilizados protocormos do *Catasetum x apolloi*, obtidos a partir da semeadura *in vitro* em meio de cultura alternativo constituído de 30g L<sup>-1</sup> de sacarose, 4g L<sup>-1</sup> de carvão ativado, 2g L<sup>-1</sup> de fertilizante B&G®, 100 mL L<sup>-1</sup> de água de coco (RODRIGUES et al., 2012).

A condução do experimento foi em delineamento inteiramente casualizado. Foram utilizados 5 protocormos de *Catasetum x apolloi* em cada repetição, em um total de 4 repetições por tratamento, totalizando 24 frascos com capacidade de 300mL contendo 50 mL do meio de cultura para cada tratamento. Os tratamentos foram os seguintes: 0, 1, 2, 3, 4 e 5 mL L<sup>-1</sup> de licor pirolenhoso obtido a partir da combustão da madeira de teca (*Tectona grandis*) analisando-se 20 plântulas por tratamento. O pH dos meios de cultura foram ajustados em 5,5, geleificados com 4g L<sup>-1</sup> de ágar e posteriormente autoclavados a 121°C sobre a pressão de 1 kg cm<sup>-2</sup> por 20 minutos. Após esterilizados o licor pirolenhoso foi acrescentado ao meio de cultura e deixados esfriar na capela de fluxo laminar sob ação de luz U.V (ultra violeta) por 20 minutos.

Os tratamentos foram mantidos à luz (2.000 lux) por 16 horas diárias a uma temperatura de ± 1°C. O experimento foi acompanhado semanalmente durante 32 semanas. As variáveis analisadas por planta foram: número de folhas, comprimento da maior folha, comprimento de folhas, número de raízes, comprimento da maior raiz, comprimento de raízes, tamanho total e massa fresca. Para as medidas foi utilizado o paquímetro digital e peso da massa fresca foi aferido na balança semianalítica.

As variáveis foram submetidas ao teste de regressão linear ou à comparação de médias de dupla saída quando os valores não se encaixarem no teste de regressão linear, utilizando-se o software SISVAR versão 5.1 (FERREIRA, 2011). As médias das variáveis obtidas pelo teste de comparação de médias foram transformadas para raiz quadrada de x para diminuir os coeficientes de variação se adequarem ao teste de comparação de médias.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados das variáveis X e Y, que foram inicialmente analisados pela análise de regressão, apresentaram baixos valores de coeficiente de determinação, para os ajuste de regressão linear simples. Por essa razão, realizaram-se a análise estatística pelo teste de média. Este padrão também foi relatado por RADMANN et al., (2002), onde os coeficientes de determinação (R<sup>2</sup>) foram baixos, não se enquadrando nos modelos de regressão lineares, optando-se pela comparação de médias.

As médias para o número de folhas variaram de 3,90 à 5,45, e por sua vez, apresentaram diferença estatística entre si. O tratamento com 3 mL L<sup>-1</sup> de pirolenhoso apresentou a menor média, contudo, este não diferiu dos tratamentos com 2 e 4 mL L<sup>-1</sup>. Para a espécie *Catasetum longifolium* a maior média foi encontrada no tratamento com 1 mL L<sup>-1</sup> de pirolenhoso de timburí (*Enterolobium contortisiliquum*), com média de 5,1 folhas por planta e que a partir da concentração de 2 mL L<sup>-1</sup> há um decréscimo no número de folhas, chegando a 2,90 mm no tratamento com 5 mL L<sup>-1</sup> (COSTA, 2012).

Não houve diferença significativa entre os tratamentos ao comparar as médias do número de raízes, porém o tratamento que apresentou a maior média foi o de 2 mL L<sup>-1</sup> de licor pirolenhoso e a menor média no meio de cultura com adição de 4 mL L<sup>-1</sup> de pirolenhoso. SILVA (2013) também relata que não houve diferença estatística entre as médias utilizando pirolenhoso de timburí com a espécie *Catasetum schmidtianum*, entretanto a maior e menor média foram encontradas em 0 (5,0) e 2 mL L<sup>-1</sup> (3,8) de pirolenhoso respectivamente. Nos resultados obtidos por COSTA (2012) analisando o crescimento da espécie *Catasetum longifolium*, foi observado que a maior média entre os tratamentos com pirolenhoso foi encontrado no meio de cultura com 4 mL L<sup>-1</sup>, obtendo 79,70 mm e que todos os tratamentos com pirolenhoso superaram o tratamento controle.

A quantidade de raízes de uma planta *in vitro* é fator essencial para sua sobrevivência ao ser retirada deste ambiente e fazer o processo de aclimação. No processo de aclimação as plantas sofrerão estresse, já que, diminuirá a umidade, nutrientes e aumentará a temperatura e a transpiração fazendo essa perder mais água do que perdia *in vitro*. DEWIR et al., (2005) mencionam que plantas *in vitro* podem ter mais chances de sobrevivência no processo de aclimação se houver estimulação na formação de maior quantidade de raízes em plantas crescidas *in vitro*, aumentando a absorção de água compensando a sua perda pela pequena espessura da cutícula das plantas no início da aclimação.

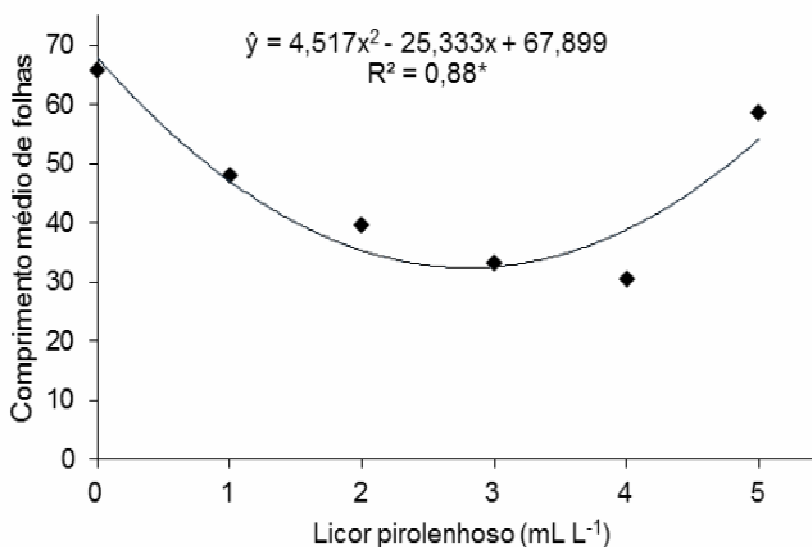
As médias da maior raiz do *Catasetum x apolloi* não diferiram significativamente entre si, variando de 47,73 mm à 75,33 mm. Diferentes resultados foram encontrados no trabalho de Ferreira (2011), ao verificar o crescimento *in vitro* dos protocormos de *Cattleya aurantiaca*, onde a maior média para tal variável foi encontrada ao adicionar 4 mL L<sup>-1</sup> do licor ao meio de cultura, sendo que, as concentrações com 2 e 5 mL L<sup>-1</sup> obtiveram valores abaixo da testemunha. Também não houve diferença significativa na variável comprimento médio de raízes, contudo o tratamento com 5 mL L<sup>-1</sup> de pirolenhoso foi aquele que apresentou a maior média. PINTO (2012) obteve resultados semelhantes para a espécie *Aspasia variegata* (Orchidaceae) tratada com pirolenhoso de timburí e para a mesma variável (CMR) não houve diferença significativa, verificando maiores médias nos tratamentos com 0 mL L<sup>-1</sup> (17,28 mm) e 5 mL L<sup>-1</sup> (17,08 mm). Para a variável massa fresca de *Catasetum x apolloi*, verificou-se que entre as médias houve diferença e o tratamento de 4 mL L<sup>-1</sup> foi aquele que obteve menor peso de plantas, porém este não diferiu dos tratamentos com 1, 2 e 3 mL L<sup>-1</sup> de licor pirolenhoso. As maiores médias foram encontradas em 0 e 5 mL L<sup>-1</sup> e estes foram os únicos que diferiram de 4 mL L<sup>-1</sup> de pirolenhoso. Quando comparado com *C. longifolium* COSTA (2012) verificou que não houve diferença entre os tratamentos nesta espécie.

**TABELA 1.** Médias do número de folhas por planta (NFP), Número de raízes por plantas (NRP), Maior raiz (MR), comprimento médio de raízes (CMR) e massa fresca por planta (PMF) de *Catasetum x apolloi*, cultivadas *in vitro* com meios de cultura em diferentes concentrações de licor pirolenhoso de teca. Alta Floresta, MT. 2014.

Extrato pirolenhoso (mL L <sup>-1</sup> )	NFP	NRP	MR (mm)	CMR (mm)	PMF (g)
0	5,35 a	3,95 a	49,48 a	27,57 a	0,64 a
1	5,35 a	3,85 a	66,32 a	38,55 a	0,53 ab
2	4,80 ab	4,60 a	54,42 a	30,45 a	0,57 ab
3	3,90 b	3,80 a	47,73 a	31,62 a	0,50 ab
4	4,15 ab	3,35 a	65,08 a	39,77 a	0,34 b
5	5,45 a	4,25 a	75,33 a	43,20 a	0,87 a
CV (%)	16,89	20,91	32,72	27,43	33,14

Médias seguidas de mesma letra, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro. (Dados transformados para raiz quadrada de x).

Os coeficientes de variação (CV) obtidos, podem ser explicados pela grande variação de todas as variáveis, porém tanto o número de folhas quanto o número de raízes obtiveram os menores CV, já que ambos apresentaram valores menos discrepantes, enquanto as outras variáveis apresentavam comprimento (mm) muito divergente, em uma mesma planta ocorreram raízes ou folhas grandes e minúsculas. Para a massa fresca, as plantas com bulbos apresentavam peso muito superior às demais, explicando o alto CV. Como demonstrado na Figura 1, houve uma queda de 32,37 mm (53%) na média de folhas ao adicionar pirolenhoso até a concentração de 2,8 mL L<sup>-1</sup>, crescendo 27,77 mm até 5 mL L<sup>-1</sup> do licor pirolenhoso.

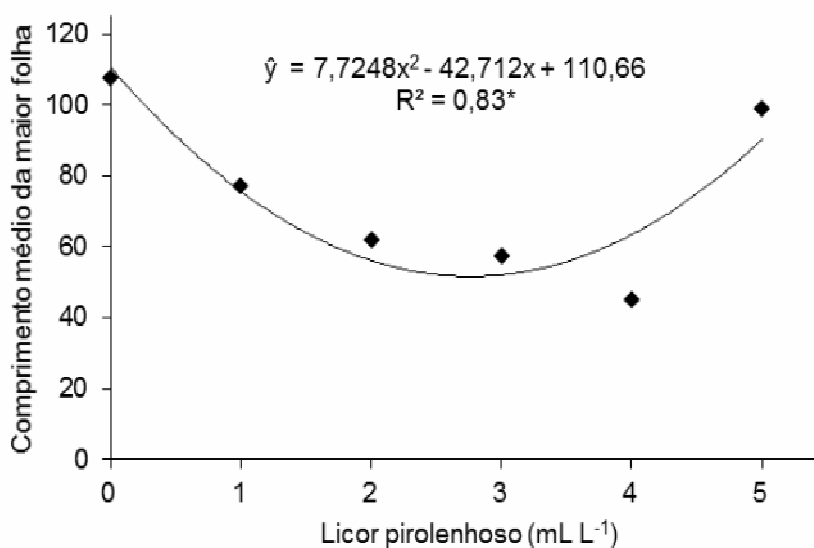


**FIGURA 1.** Comprimento médio de folhas (mm) de *Catasetum x apolloi* em diferentes concentrações do licor pirolenhoso. Alta Floresta, MT. 2014.

\* Diferença significativa entre os tratamentos

O melhor tratamento para a variável analisada foi o meio no qual não houve adição de pirolenhoso (0 mL L<sup>-1</sup>). SILVA (2013) observou que não houve diferença significativa entre os tratamentos para a variável em questão, variando de 22,8 mm à 27,6 mm o comprimento médio de folhas para espécie *C. schmidtianum*, discordando de PEREIRA (2011) onde o tratamento com 1 mL L<sup>-1</sup> apresentou-se superior aos demais, obtendo uma média de 11,70 mm avaliando a espécie *C. osculatum*.

Ao analisar a figura 2 ocorreu similaridade entre o comprimento médio de folhas, este por sua vez, também obteve uma queda na adição de pirolenhoso até a concentração de 2,76 mL L<sup>-1</sup>, cujas médias da maior folha decrescem 51,61 mm, com aumento da maior folha de 90,45 mm a partir desta concentração até a máxima (5 mL L<sup>-1</sup>). O meio de cultura sem pirolenhoso se sobressaiu em relação aos demais para tal variável.

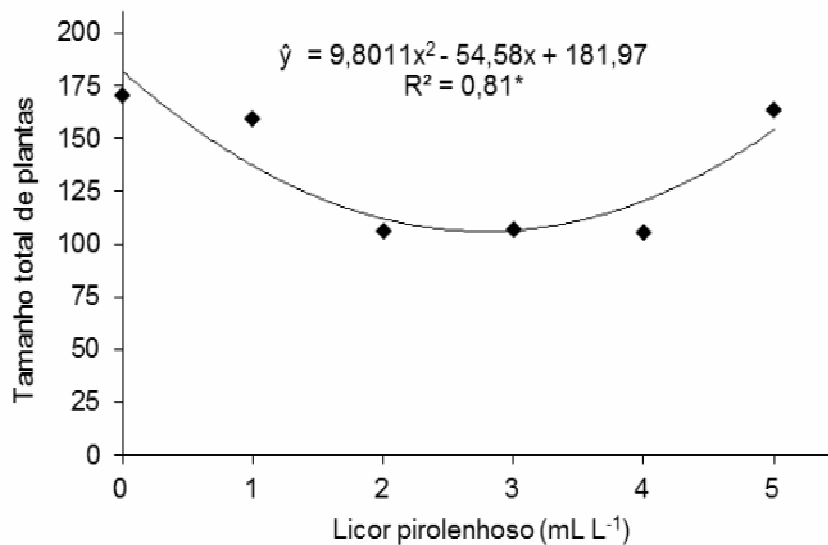


**FIGURA 2.** Comprimento médio da maior folha (mm) de *Catasetum x apolloi* em diferentes concentrações do licor pirolenhoso. Alta Floresta, MT. 2014.

\* Diferença significativa entre os tratamentos

SCHNITZER (2009) observou que para a espécie *Cattleya loddigesii* a melhor média para a variável foi obtida com 5,1 mL L<sup>-1</sup> de pirolenhoso, já para *Cattleya intermedia* o tamanho da maior folha foi diminuindo conforme aumentava a concentração de pirolenhoso até a concentração de 6 mL L<sup>-1</sup>.

Para o tamanho total (Figura 3), como nas variáveis anteriores, este apresentou redução no tamanho das plântulas com a adição do licor pirolenhoso, aumentando após o ponto mínimo de crescimento de 2,78 mL L<sup>-1</sup> com comprimento de 105,98 mm até a concentração máxima de 5ml/L, crescendo cerca de 154,1mm à partir do ponto mínimo.



**FIGURA 3.** Tamanho total de plantas (mm) de *Catasetum x apolloi* em diferentes concentrações do licor pirolenhoso. Alta Floresta, MT. 2014.

Maiores plantas foram encontradas na concentração de 0ml/L com cerca de 181,97 mm. Para a espécie *C. schmidtianum*, ao acrescentar pirolenhoso de timburi no meio de cultura, as plântulas atingem um tamanho máximo de 149,57mm com 1,1 mL L<sup>-1</sup> do licor, decrescendo a partir desta concentração até 5 mL L<sup>-1</sup> (SILVA, 2013).

### CONCLUSÕES

O tratamento que sobressaiu aos demais para as variáveis da parte aérea foi o meio contendo 0 mL L<sup>-1</sup> de licor pirolenhoso, já para as variáveis do crescimento radicular pode-se adicionar ou não qualquer quantidade do licor pirolenhoso para a espécie do *Catasetum x apolloi*.

### REFERÊNCIAS

ALVES, M. **Impactos da utilização de fino de carvão e extrato pirolenhoso na agricultura.** 2006, 43 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal.

COSTA, L. G. **Efeito do extrato pirolenhoso no desenvolvimento de protocormos de *Catasetum longifolium* Rich.** 2012, 12f. Monografia (Bacharelado em Agronomia)- Universidade do Estado de Mato Grosso, Alta Floresta.

DEWIR, Y. H., CHAKRABARTY, D., ALI, M. B., HAHN, E. J. & PAEK, K. Y. Effects of hydroponic solution EC, substrates, PPF and nutrient scheduling on growth and photosynthetic competence during acclimatization of micropropagated *Spathiphyllum* plantlets. **Plant Growth Regulation**, v.46, p. 241-251, 2005.

FERREIRA, D. A. T. **Germinação e desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya - aurantiaca* Bateman ex Lindley em meio de cultura alternativo com diferentes concentrações de extrato do licor pirolenhoso.** 2011.18f. Monografia

(Licenciatura em Ciências Biológicas)- Universidade do Estado de Mato Grosso, Alta Floresta.

FERREIRA, D. S. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia (UFLA)**, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

GLASS, V. **Tecnologia**. (online),2004. Disponível em: <http://www.biocarbo.com/Arquivos/globo.pdf>. Acesso em: 19 de fevereiro de 2014.

HEW, C. S; YONG, J. W. H. **The physiology of tropical orchids in relation to the industry**. 2nd ed. Singapore: World Scientific Publishing, 2004,369p.

KLEIN, E.H.S. **Levantamento e desenvolvimento de kit diagnóstico de patógenos e propagação *in vitro* de orquídeas no estado de Rio de Janeiro**. 2008. 72 f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade e Biotecnologia)- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

KRAMER, J. **Orquídeas**. Salamandra, 1989, 276 p.

PEREIRA, A. P. S. **Extrato pirolenhoso no desenvolvimento de *Catasetum osculatum* Lacerda & P. Castro**. 2011, 7f. Monografia (Bacharelado em Agronomia)- Universidade do Estado de Mato Grosso, Alta Floresta.

PETINI-BENELLI, A; GRADE, A. *Catasetum apolloi* Benelli & Grade (Orchidaceae): correction taxinomique. **Richardiana**, França, v. 7, n. 4, p. 153-157, 2012.

PINTO, F. C. **Desenvolvimento *in vitro* de protocormos de *Aspasia variegata* Lindley em diferentes concentrações de extrato pirolenhoso**. 2011, 11f. Monografia (Licenciatura em Ciências Biológicas)- Universidade do Estado de Mato Grosso, Alta Floresta.

RADMANN, E. B; FACHINELLO, J. C; PETERS, J. A. **Ver. Bras. Frutic.**, Jaboticabal, v. 24, n. 3, p. 624-628, 2002.

RODRIGUES, D. T.; NOVAIS, R.F.; ALVAREZ, V.H.; DIAS, J M .M.; OTONI, W.C.; VILLANI, E. M.A. Cultivo *in vitro* de plântulas de orquídea em meios com diferentes concentrações de fertilizante mineral. **Rev. Ceres**, Viçosa, v. 59, n.1, p. 9-15, jan/fev, 2012.

SCHNITZER, J.A. **Extrato pirolenhoso no cultivo de orquídeas**. 2009. 59 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia)- Universidade estadual de Londrina,Londrina.

SILVA, M. F. F. **Efeito do extrato pirolenhoso de timburi no desenvolvimento de *Catasetum Schmidtianum* Miranda & Lacerda**. 2013, 33f. Monografia (Bacharelado em Agronomia)- Universidade do Estado de Mato Grosso, Alta Floresta.

SUTTLEWORTH, F.S; ZIM, H.S; DILLONED, G.W. **Orquídeas: guia dos orquidófilos**. Rio de Janeiro: Expressão e Cultura, 1994. 158p.



UNEMOTO, L. K; FARIA, R. T; VIEIRA, A. O. S; DALIO, R, J, D. Propagação *in vitro* de orquídeas brasileiras em meio de cultura simplificado. **Ver. Bras. De Agrocência**, Pelotas, v. 13, n. 2, p. 267-269, 2007.