

Desenvolvimento *in vitro* de copo-de-leite: efeito das concentrações de sacarose e de ácido giberélico

In vitro development of calla lily: effect of sucrose and gibberellic acid concentrations

Márcia de Nazaré Oliveira Ribeiro^{1*}; Moacir Pasqual²;
Fabíola Villa¹; Ludmilla de Lima Cavallari³

Resumo

O copo-de-leite (*Zantedeschia aethiopica*) é bastante apreciado tanto como flor de corte quanto para a composição de jardins. Entretanto, muitos patógenos afetam esta cultura. Pelo método tradicional de propagação, somente algumas unidades de novas mudas são obtidas anualmente. A cultura de tecidos, além de permitir rápida propagação clonal em larga escala, também proporciona a obtenção de plantas uniformes e sadias. Durante o cultivo *in vitro*, o tipo e a concentração de reguladores de crescimento podem afetar o crescimento dos explantes e por isso objetivou-se estabelecer concentrações ideais de sacarose e de ácido giberélico (GA₃) para aumentar a eficiência da multiplicação *in vitro* de copo-de-leite. Após 60 dias de cultivo em meio de cultura MS, suplementado de diferentes concentrações de sacarose e GA₃, avaliou-se: número de folhas, brotos e raízes, comprimento e peso fresco da parte aérea e das raízes. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com quatro repetições. Maior número de brotos foi obtido na condição de 60,5 g L⁻¹ de sacarose associado a 5 mg L⁻¹ de GA₃. Para obter maior comprimento da parte aérea, deve-se adicionar ao meio de cultura 45,3 g L⁻¹ de sacarose e 10 mg L⁻¹ GA₃. Melhores resultados para comprimento e número de raízes foram observados somente na presença de sacarose, em concentrações de 51,13 a 56,5 g L⁻¹.

Palavras-chave: Cultura de tecidos, carboidrato, regulador de crescimento

Abstract

Calla lily (*Zantedeschia aethiopica*) is appreciated as cut flower and for the composition of gardens. However, many pathogens affect this species. By the traditional method of propagation, some units of new seedlings can only be produced annually. Tissue culture allows fast large-scale clonal propagation and provides healthy uniform plants. During the *in vitro* process, type and concentration of growth regulator could affect the growth of seedlings. Thus, the aim of this work was to determine sucrose and GA₃ concentrations to increase the efficiency of the *in vitro* multiplication of calla lily. After 60 days, the length of the above ground part and the roots, the number of sprouts, roots and leaves, above ground part and root fresh weight of seedlings were evaluated. The experimental design was entirely randomized with four replications. It was necessary the addition of 60.5 g L⁻¹ sucrose associated to 5 mg L⁻¹ GA₃ to obtain high sprouts number. For higher length of the above ground part the addition of 45.3 g L⁻¹ sucrose and 10 mg L⁻¹ GA₃ was enough. Better results in the root length and number of roots were observed only in the sucrose presence, in concentrations in the range of 51.13 – 56.5 g L⁻¹.

Key words: Tissue culture, carbohydrate, growth regulator

¹ Eng^a. Agr^a., M.Sc., Doutoranda em Agronomia/Fitotecnia, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Caixa Postal 3037, 37200-000, Lavras-MG. E-mail: mribeiro@posgrad.ufla.br; marcia_162@hotmail.com

² Eng^o. Agr^o., D.Sc., Prof. Titular da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras-MG.

³ Eng^a. Agr^a., Mestranda em Produção Vegetal, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, 14884-900, Jaboticabal-SP.

* Autor para correspondência

Introdução

O gênero *Zantedeschia*, conhecido como ‘arum ou calla lily’, é originário da África. A espécie mais conhecida é o copo-de-leite branco (*Zantedeschia aethiopica*), porém existem seis outras espécies e três subespécies com flores coloridas, que vão do “pink” ao castanho. Como flores de corte, são populares em todo o mundo, e uma gama de cultivares e híbridos estão disponíveis (TIJA, 1989; KUEHHY, 2000). Na natureza, cresce em áreas brejeiras e beiradas de rio, o que não é muito recomendável, pois estes ambientes favorecem a infestação por bactérias e fungos (ALMEIDA; PAIVA, 2005). A principal doença que ataca esta cultura é a podridão-mole, causada pela bactéria *Erwinia* (WELSH; CLEMENS, 1992).

A propagação de copo-de-leite pode ser feita através de sementes, por divisão de touceiras e/ou rizomas, e por cultura *in vitro* de tecidos. A propagação por sementes não é recomendada, devido à desuniformidade das mudas e pela polinização cruzada (SALINGER, 1991). Esta espécie é muito susceptível a pragas e doenças, e o ideal é a utilização de mudas micropropagadas em laboratórios especializados (ALMEIDA; PAIVA, 2005).

Com o crescimento mundial do comércio de flores e plantas ornamentais, há necessidade de melhoria da qualidade das mudas. Isto pode ser obtido através da micropropagação, que gera mudas isentas de fitopatógenos (SEGEREN et al., 2003).

Existem poucos trabalhos sobre cultivo *in vitro* desta espécie, portanto, objetivou-se estabelecer concentrações ideais de sacarose e de ácido giberélico (GA_3) visando aumentar a eficiência do crescimento *in vitro* desta espécie.

Material e métodos

O trabalho foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, localizado no Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

Explantos de copo-de-leite foram obtidos de material preestabelecido *in vitro*. Os explantes obtidos foram inoculados em tubos de ensaio (200 mm x 25 mm), contendo 15 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962).

Os tratamentos foram constituídos de concentrações de sacarose (0; 10; 20; 40 e 80 g L⁻¹) e GA_3 (0; 2,5; 5; 10 e 20 mg L⁻¹), nas combinações possíveis para essas concentrações. O meio foi solidificado com 5,5 g L⁻¹ de ágar e o pH ajustado para $5,8 \pm 0,1$ antes da autoclavagem realizada a 121°C e 1 atm por 20 minutos. Posteriormente à inoculação, os tubos foram transferidos para sala de crescimento a $27 \pm 1^\circ\text{C}$, irradiância de 35 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas. Após 60 dias, avaliou-se o comprimento da parte aérea e das raízes, número de brotos, raízes e de folhas, massa fresca da parte aérea e das raízes.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro repetições de três tubos cada, totalizando 12 plantas por tratamento. Os resultados foram submetidos à análise de variância, utilizando o software Sisvar (FERREIRA, 2000).

Resultados e discussão

Observou-se interação significativa para as variáveis número de brotos e comprimento da parte aérea e maior número de brotos (1,6) foi observado na presença de 60,5 g L⁻¹ de sacarose e 5 mg L⁻¹ de GA_3 (Figura 1). Para a parte aérea, maior comprimento (2,2 cm) foi observado na condição de 45,3 g L⁻¹ de sacarose associada a 10 mg L⁻¹ de GA_3 (Figura 2).

O efeito mais conhecido das giberelinas *in vitro* é no alongamento da parte aérea e das brotações, durante a multiplicação, ou antes, do enraizamento *in vitro* e varia conforme a interação existente com outros reguladores de crescimento, dependendo da espécie propagada *in vitro* (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998), sendo que o GA_3 proporcionou maior comprimento da parte aérea em jenipapo (*Genipa americana*) (COSTA et al., 2002).

Figueiredo, Albarello e Viana (2001) relatam a necessidade do GA₃ para o alongamento das brotações de *Rollinia mucosa*. Gomes (1999) observou que a utilização de GA₃ em concentrações que variam de 1 a 6 mg L⁻¹ favorece o crescimento e o desenvolvimento *in vitro* de brotações de moreira (*Maclura tinctoria*).

Diniz et al. (2003), observaram em macela (*Egletes viscosa*), que o maior crescimento em altura ocorreu no tratamento com 0,5 mg L⁻¹ de GA₃, o qual apresentou diferença estatística altamente significativa (1% de probabilidade) em relação aos demais tratamentos.

A sacarose foi o carboidrato que melhor respondeu para número e altura de brotações em ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata*) (NICOLOSO et al., 2003).

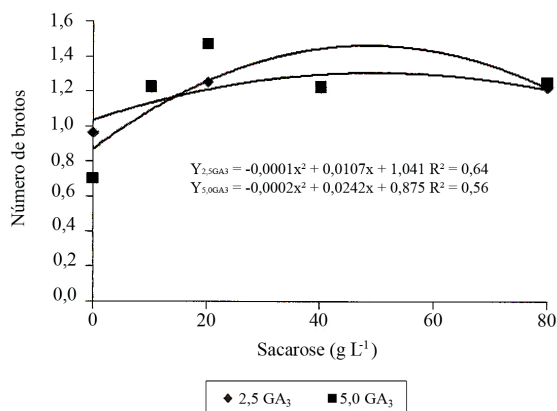


Figura 1. Número de brotos em explantes de copo-de-leite submetidos a diferentes concentrações de sacarose e GA₃, após 60 dias de cultivo.

Concentrações de 2 a 4% de sacarose são mais usuais. Abaixo desta faixa, pode ocorrer clorose e, acima, pode-se incorrer em excessivo potencial osmótico do meio, possibilitando deterioração das culturas (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

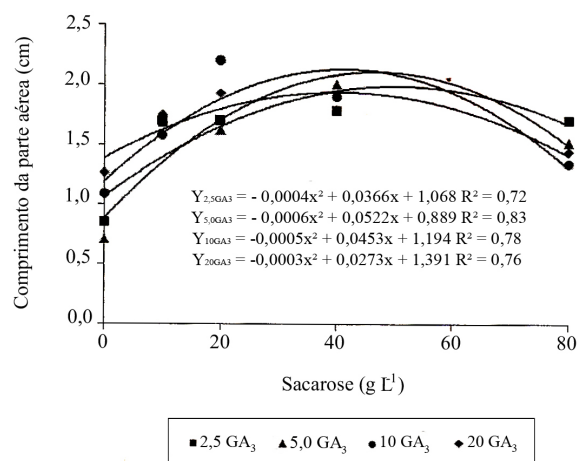


Figura 2. Efeito das diferentes concentrações de sacarose e GA₃ no comprimento da parte aérea de copo-de-leite, após 60 dias de cultivo.

Para a variável número de folhas, apenas a sacarose foi significativa. Maior número de folhas (1,32) foi observado na presença de 37,3 g L⁻¹ de sacarose (Figura 3). Por outro lado, em rosa (*Rosa* spp.) um aumento na concentração de sacarose no meio de 3% para 5% promoveu aumento de massa, em explantes micropropagados sob condições heterotróficas ou mixotróficas (CAPELLADES; LEMEURE; DEBERGH, 1991).

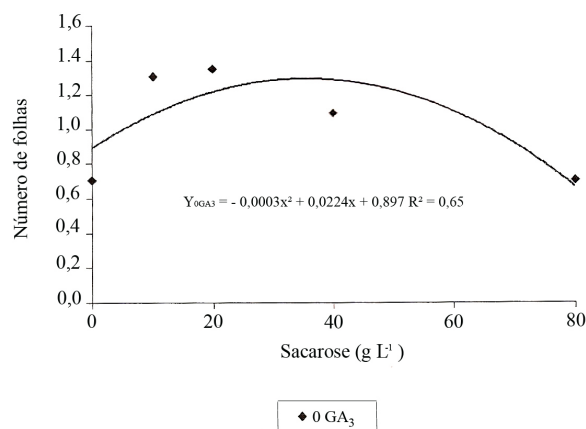


Figura 3. Número de folhas de copo-de-leite em diferentes concentrações de sacarose e GA₃, após 60 dias de cultivo.

Maior comprimento de raízes (3,0 cm) foi obtido com 56,5 g L⁻¹ de sacarose e maior número de raízes (1,9) com 51,13 g L⁻¹ (Figuras 4 e 5). A presença de sacarose mostrou-se fundamental para o desenvolvimento das raízes *in vitro*, tendo em vista que na sua ausência não houve enraizamento. Os dados obtidos estão de acordo com a afirmação de vários autores de que este carboidrato é essencial para o enraizamento *in vitro* de muitas espécies (SRIKANDARAJAH; MULLINS, 1981; MC COWN, 1988). Lane (apud GEORGE, 1996), observou que o enraizamento *in vitro* de maçã foi dependente da sacarose. Concentrações abaixo de 20 g L⁻¹ e acima de 52 g L⁻¹ de sacarose reduziram a formação de raízes. Wainwright e Scrace (1989) observaram que níveis crescentes de sacarose não afetaram o enraizamento *in vitro*, nem o estabelecimento *in vivo* de cinco-folhas (*Potentilla fruticosa* L.) e ficus-lira (*Ficus lyrata* Warburg). Do mesmo modo, Srikandarajah e Mullins (1981) obtiveram melhores resultados no enraizamento *in vitro* de macieira ‘Granny Smith’ com a utilização de apenas 10 g L⁻¹ de sacarose.

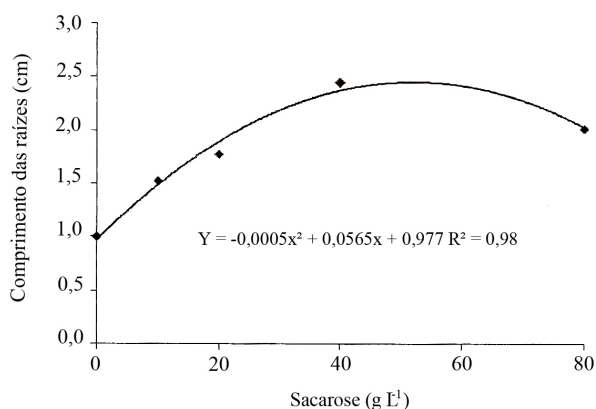


Figura 4. Comprimento de raízes de copo-de-leite, em diferentes concentrações de sacarose e GA3, após 60 dias de cultivo.

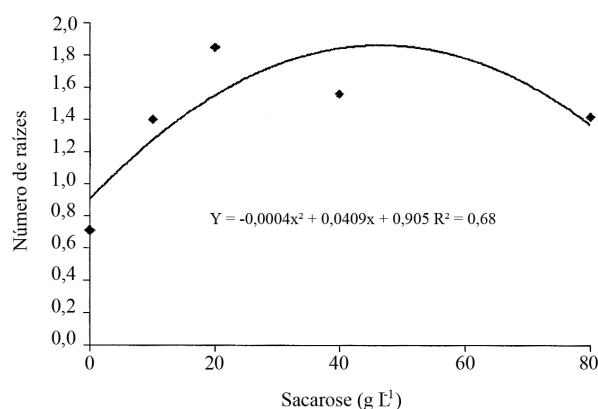


Figura 5. Número de raízes de copo-de-leite, em diferentes concentrações de sacarose e GA3, após 60 dias de cultivo.

Maior massa fresca da parte aérea (0,81 g) foi observado na presença de 46, 25 g L⁻¹ de sacarose (Figura 6), enquanto para raízes (0,76 g) maior massa fresca foi obtida com 52,5 g L⁻¹ de sacarose (Figura 7). Nicoloso et al. (2003) observaram que a elevação da concentração de sacarose de 30 até 60 g L⁻¹ promoveu maior produção de biomassa dos órgãos de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata*) cultivadas *in vitro*. O aumento da produção de biomassa da raiz para a cultura do morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch) foi crescente até 45 g L⁻¹ de sacarose (CALVETE, 1998). Não se observaram bons resultados na propagação *in vitro*, em presença de sacarose, para samambaia-espada (*Nephrolepis exaltata* L. Schott) (GUIMARÃES; PASQUAL; MIRANDA, 1999).

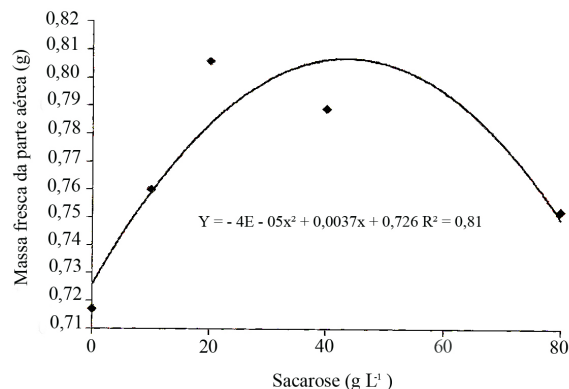


Figura 6. Massa fresca da parte aérea de copo-de-leite influenciada por diferentes concentrações de sacarose, após 60 dias de cultivo.

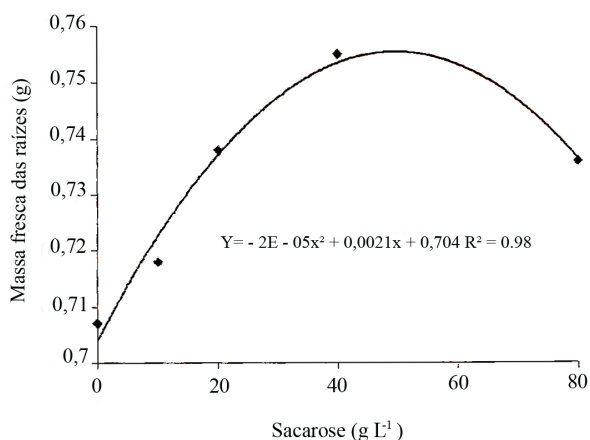


Figura 7. Massa fresca das raízes de copo-de-leite, cultivadas por 60 dias, em diferentes concentrações de sacarose.

Conclusões

A adição de 60,5 g L⁻¹ de sacarose associada a 5 mg L⁻¹ de GA₃ propicia a formação de maior número de brotos. Adicionando-se 45,3 g L⁻¹ de sacarose com 10 mg L⁻¹ de GA₃ se obtêm maior comprimento da parte aérea. Melhores resultados para comprimento e número de raízes são observados na presença de 51,13 a 56,5 g L⁻¹ de sacarose, respectivamente.

Agradecimentos

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo suporte financeiro e à Universidade Federal de Lavras (UFLA), pelo incentivo à pesquisa.

Referências

ALMEIDA, E. F. A.; PAIVA, P. D. O. Cultivo de copo-de-leite. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, v. 26, n. 227, p. 30-35, 2005.

CALVETE, E. O. *Concentrações de sacarose in vitro e seleção de substratos para aclimatização ex vitro de morangueiro cv Campinas (Fragaria ananassa Duch.)*. 1998. 108f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1998.

CAPELLADES, M.; LEMEUR, R.; DEBERGH, P. Effects of sucrose on starch accumulation and rate of photosynthesis in *Rosa* cultured *in vitro*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v. 25, n. 1, p. 21-26, 1991.

COSTA, M. A. P. C.; CARMO, D. O.; SOUZA, F. V. D.; MAGALHÃES, G. L.; HANSEN, D. S. Efeito de diferentes concentrações de GA₃ no alongamento de brotações *in vitro* de jenipapo (*Genipa americana*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 17., 2002, Belém. *Anais...* Belém: SBF, 2002. CD-ROOM.

DINIZ, J. D. N.; ALMEIDA, J. L.; TEIXEIRA, A. L. A.; GOMES, E. S.; HERNANDEZ, F. F. F. Ácido giberélico (GA₃) e 6-Benzilaminopurina (BAP) no crescimento *in vitro* de macela [*Egletes viscosa* (L.) Less.]. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 27, n. 4, p. 934-938, 2003.

FIGUEIREDO, S. F. L.; ALBARELLO, N.; VIANA, V. R. C. Micropropagation of *Rollinia mucosa* (Jacq.) baill *in vitro* cellular & developmental. *Biology Plant*, Wallingford, v. 37, n. 4, p. 471-475, 2001.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. *Anais...* São Carlos: UFSCar, 2000, p. 255-258.

GOMES, G. A. C. *Propagação in vitro de moreira (Maclura tinctoria)*. 1999. 91 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1999.

GEORGE, E. F. *Plant propagation by tissue culture: practice*. 2. ed. Edington: Exegetics, 1996. Part 2.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. L.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. S. (Ed.). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: EMBRAPA, 1998. p. 183-260.

GUIMARÃES, P. T. C.; PASQUAL, M.; MIRANDA, A. M. P. Efeito de diferentes concentrações de nitrogênio e de sacarose sobre a propagação *in vitro* de samambaia-espada [*Nephrolepis exaltata* (L.) Schott]. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 23, n. 2, p. 309-316, 1999.

KUEHHY, J. S. Calla history and culture. *HortTechnology*, Alexandria, v. 10, n. 2, p. 267-274, 2000.

MC COWN, B. H. Adventitious rooting of tissue cultured plants. In: DAVIS, T.; HAISSIG, B. E.; SANKLA, N. (Eds.). *Adventitious root formation in cuttings*. Portland-Oregon: Dioscorides, 1988. v. 2, p. 289-299.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NICOLOSO, F. T. ; ERIG, A. C. ; RUSSOWSKI, D. ; MARTINS, C. F. Efeito de concentrações e fontes de carboidratos no crescimento de plantas de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen) cultivadas *in vitro*. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 27, n. 1, p. 84-90, 2003.

SALINGER, J. P. *Producción comercial de flores*. Zaragoza: Acribia, 1991.

SEGEREN, M. I.; CAMPOS, K. J. P.; CORRÊA, M. G. S.; DIAS, J. C. S. Avaliações de fitossanidade de clones de orquídeas no laboratório Proclone. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 14.; CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS, 1., 2003, Lavras. *Resumos...* Lavras: UFLA/FAEPE, 2003, p. 423.

SRIKANDARAJAH, S.; MULLINS, M. G. Micropropagation of Granny Smith apple: factors affecting root formation “*in vitro*”. *Journal of Horticultural Science*, Ashford, v. 56, n. 1, p. 71-76, 1981.

WAINWRIGHT, H.; SCRACE, J. Influence of “*in vitro*” preconditioning with carbohydrates during the rooting of microcuttings on “*in vitro*” establishment. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, v. 38, n. 3/4, p. 261-267, 1989.

WELSH, T. E.; CLEMENS, J. Protected cropping of *Zantedeschia* tubers and cutflowers in New Zealand. *Acta Horticulture*, The Hague, v. 319, n. 52, p. 335-340, 1992.

TIJA, B. *Zantedeschia*. In: HALEVY, A. H. *Handbook of flowering*. Boca Raton: CRC Press, 1989. p. 697-702.