

# PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE *Kalanchoe blossfeldiana* Poelln., VIA ORGANOGÊNESE

*In vitro* PROPAGATION OF *Kalanchoe blossfeldiana* Poelln., BY ORGANOGENESIS

THOMÉ, Gladis C. H.<sup>1</sup>; GRESSLER, Pablo D.<sup>2</sup>; SANTOS, Genise dos<sup>2</sup>

## RESUMO

Este trabalho teve como objetivo estudar os processos fisiológicos envolvidos no estabelecimento de protocolos de micropropagação do calanchoe (*Kalanchoe blossfeldiana* Poelln.) via organogênese. Foram testados dois cultivares, Gold Strike e Klabat, utilizando diferentes tipos de explantes: segmentos de limbo e de pecíolo. Após desinfecção, os explantes foram inoculados em meio de cultura MS, acrescido de BAP (0; 0,5 e 1,0 mg L<sup>-1</sup>) na 1ª etapa e posteriormente transferidos para meio MS acrescido de BAP (0; 0,5 e 1,0 mg L<sup>-1</sup>) combinado com 0,03 mg L<sup>-1</sup> de ANA ou AIB. As culturas foram mantidas sob temperatura de 25±1°C e fotoperíodo de 14h. As respostas morfogênicas iniciaram 21 dias após a inoculação dos explantes. Nenhuma das condições de cultura testadas induziu a organogênese direta, sendo que a formação de gemas aéreas adventícias foi sempre precedida da formação de calos. O tratamento que induziu maior quantidade de calos e gemas aéreas adventícias foi a utilização de segmentos de limbo do cv. Klabat, cultivados em meio MS + 1,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0,03 mg L<sup>-1</sup> ANA. Foi observada influência do genótipo e tipo de explante sobre a indução de resposta morfogênica, sendo que o cv. Gold Strike mostrou ser recalcitrante quando comparado ao cultivar Klabat, o mesmo acontecendo com explantes de pecíolo para ambos os genótipos testados.

Palavras-chave: micropropagação, calanchoe, BAP, ANA.

## INTRODUÇÃO

O mercado de flores e plantas ornamentais movimenta, no Brasil, aproximadamente R\$ 1,1 bilhão por ano no varejo, segundo estimativas da Cooperativa Agrícola Holambra, responsável por 35% da produção de flores no País. No Rio Grande do Sul, o consumo de flores e plantas ornamentais é reconhecidamente acima da média nacional. Informações estatísticas obtidas na CEASA-RS indicam que o mercado gaúcho absorve toda a produção do Estado, além de depender do mercado externo (KÄMPF & DAUT, 1999).

Com alta produtividade por área produzida, a floricultura no Rio Grande do Sul tem contribuído para viabilizar as pequenas propriedades rurais. Assim, além de auxiliar na fixação da população rural, o setor também se destaca como gerador de empregos em atividades agrícolas levando o floricultor a assumir o perfil de empresário rural.

Entretanto, devido à carência de tecnologia voltada ao setor, os produtores do sul do Brasil são praticamente dependentes da produção e fornecimento de mudas de outros estados onde o setor apresenta um desenvolvimento tecnológico mais avançado. Além da dependência tecnológica, este fato onera ainda mais o setor produtivo, representando significativo incremento nos custos de produção. Todos estes fatores justificam a preocupação dos produtores em expandir a

produção e melhorar a qualidade destas culturas, objetivos estes que podem ser alcançados através de técnicas como a micropropagação.

A micropropagação é uma das aplicações da técnica de cultura de tecidos vegetais *in vitro* e consiste na propagação de plantas em laboratório, sob adequadas condições de assepsia e fatores ambientais como nutrientes, luz, temperatura, O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> (BARRUETO CID, 2001). A técnica baseia-se na totipotência celular, ou seja, a capacidade que as células vegetais apresentam de originar um organismo completo, via regeneração (STEWART, 1983).

Segundo GEORGE & SHERRINGTON (1984), novas plantas completas podem ser obtidas por três principais vias: através da embriogênese somática; a partir de meristemas ou gemas pré-existentes, os quais são induzidos a crescerem; da morfogênese de gemas aéreas adventícias (organogênese), e seu posterior enraizamento.

CHRISTIANSON & WARNICK (1988), dividiram o processo de organogênese *in vitro* nas seguintes etapas: desdiferenciação, aquisição de competência, indução, determinação, diferenciação e formação do órgão.

Conforme TISSERAT (1991), considera-se adventícia a gema que se forma em qualquer parte da planta onde normalmente não ocorreria sua formação, ou seja, fora do ápice caulinar ou axilas foliares. A gema é uma estrutura unipolar e fisicamente conectada ao tecido de origem.

A regeneração de plantas através de organogênese pode ocorrer de dois modos: através da produção de gemas aéreas adventícias diretamente do explante, sem proliferação de tecidos não diferenciados; através da regeneração de gemas aéreas adventícias partir de calos derivados de explantes. HICKS (1980) descreve estes dois métodos de morfogênese como direta e indireta, respectivamente. Em ambos os casos, como as células começam a constituir um novo meristema, adotam um diferente programa inerente (ou redeterminação), o qual determina o subsequente padrão de desenvolvimento.

Entre as diversas espécies de flores cultivadas com fins comerciais e que apresentam ótima aceitação no mercado, está o calanchoe (*Kalanchoe blossfeldiana* Poelln.). O calanchoe, originário de Madagascar, é uma planta suculenta da família *Crassulaceae* que requer alta intensidade de luz e necessita de dias curtos (menos de 12 horas) e temperatura noturna de 17°C para rápido florescimento (PAPAFOTIOU & SCHWABE, 1990).

Inicialmente a propagação por sementes foi o melhor método para propagação do calanchoe em nível comercial, porém esta é uma tarefa trabalhosa e demorada uma vez que a espécie apresenta sementes extremamente pequenas; em uma grama são encontradas em torno de 90 mil sementes

<sup>1</sup> Bióloga, Dra., Profa. do Departamento de Biologia, Universidade de Santa Cruz do Sul (UNISC). Av. Independência, 2293 - Santa Cruz do Sul, RS, 96815-900. E-mail: gthome@unisc.br. Autor para correspondência.

<sup>2</sup> Bolsista de Iniciação Científica PUIC, aluno do Curso de Ciências Biológicas da UNISC.

(Recebido para publicação em 27/05/2003, Aprovado em 04/10/2003)

(PAPAFOTIOU & SCHWABE, 1990). Segundo os autores, a germinação ocorre após 7 a 10 dias com temperatura ao redor de 25°C. Geralmente, necessita-se de 7 semanas para o desenvolvimento das mudas para que possam ser transplantadas.

Para a produção de flor de vaso, a estaquia apical constitui o método mais usual entre os produtores. As estacas são colocadas para enraizar em substrato de sub-solo argiloso ou arenoso de acordo com a disponibilidade do produtor. O enraizamento ocorre após 3 ou 4 semanas, daí é transplantada para o vaso definitivo. Entre a obtenção da estaca e a planta pronta para venda decorrem de 105 a 120 dias.

Pesquisas realizadas com o calanchoe são feitas basicamente à procura de novos substratos para o enraizamento e produção de mudas desta espécie (GONÇALVES & MINAMI, 1994).

A técnica de micropropagação pode apresentar, para muitas espécies vegetais, soluções para problemas como dificuldade de enraizamento e produção de mudas com maior eficiência, uniformidade e tempo reduzido. A partir de uma única matriz é possível produzir centenas de mudas idênticas à original, com todas as suas características e vantagens como: mudas sadias de matrizes selecionadas, tamanho uniforme, melhor desempenho no campo e maior produtividade.

Assim, o objetivo principal deste trabalho foi estudar os processos fisiológicos envolvidos no estabelecimento de protocolos eficientes de micropropagação de calanchoe, testando diferentes genótipos, tipos de explantes e condições de cultura para a micropropagação e enraizamento de gemas aéreas adventícias.

## MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia da Universidade de Santa Cruz do Sul, de março a dezembro de 2001. As plantas matrizes foram fornecidas pela Cooperativa Riograndense de Flores e Plantas Ornamentais (RS Flores) de Santa Cruz do Sul, RS, e mantidas no Laboratório, em estágio vegetativo. Foram testados dois genótipos: cv. Gold Strike e cv. Klabat.

O material vegetal fonte de explante (limbos foliares e pecíolos) foi retirado da planta matriz e lavado em água corrente. Em seguida, foi desinfetado em álcool 70% durante 2 min, seguido de imersão em solução de hipoclorito de sódio com 1% de cloro ativo, ficando sob agitação durante 15 minutos. Após, foi lavado com água esterilizada por três vezes em capela de fluxo laminar.

Segmentos de limbo e de pecíolo, de aproximadamente 0,5 x 0,5cm, obtidos de folhas jovens, consistiram os explantes, os quais foram inoculados em placas de petri contendo 40 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) acrescido de 30 mg L<sup>-1</sup> de sacarose e solidificado com 8 g.L<sup>-1</sup> de agar, com pH ajustado para 5,7 antes da autoclavagem. Nesta etapa do experimento (Etapa 1), que teve a duração de 35 dias, o meio foi suplementado com BAP (benzilaminopurina) em diferentes concentrações (0; 0,5 e 1,0 mg L<sup>-1</sup>) na indução dos explantes. Em função da concentração de citocinina, os meios de cultura foram denominados M0, M0,5 e M1, respectivamente.

Após a indução (Etapa 2), cada explante foi transferido individualmente para um vidro com capacidade de 100 mL, contendo 25 mL de meio de cultura, que consistiu no meio

inicial acrescido da auxina ANA (ácido naftaleno-acético) ou AIB (ácido indol butírico) a fim de induzir o desenvolvimento e multiplicação das gemas aéreas adventícias. A concentração de auxina utilizada foi a mesma para todos os tratamentos (0,03 mg L<sup>-1</sup>). Os explantes permaneceram nesta etapa por 45 dias, com uma repicagem na metade deste período.

As gemas induzidas, ao atingirem em torno de 3 cm de comprimento, foram transferidas para meio de enraizamento (Etapa 3), que consistiu no meio MS na metade da concentração de sais, suplementado com 1 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado, auxina AIB (ácido indol-butírico) na concentração de 1 mg L<sup>-1</sup> e solidificado com 7 g.L<sup>-1</sup> de Agar, onde permaneceram por 10 dias. As plantas enraizadas foram transferidas para solo e aclimatadas durante 14 dias em câmara úmida.

Todas as culturas foram mantidas em ambiente controlado, no escuro ou sob fotoperíodo de 14 horas e temperatura de 25±1°C, em câmara do tipo B.O.D. As culturas foram estabelecidas no delineamento de blocos ao acaso, com quatro repetições e número inicial de oito explantes/repetição. As variáveis avaliadas nas diferentes etapas dos experimentos foram: genótipo, tipo de explante, influência da luz na indução de gemas e concentração de BAP.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente foi estabelecido um experimento para testar a influência da luz na fase de indução dos explantes. Observou-se que a ausência de luz inibia a morfogênese em explantes foliares, tanto do cv. Klabat como do cv. Gold Strike (Tabela 1). Por este motivo, em todos os demais experimentos a fase de indução foi estabelecida em presença de luz.

Quanto às culturas utilizando segmentos de pecíolo como explante, não foi observada morfogênese em nenhum dos tratamentos, indicando que a utilização deste tipo de explante é inviável para os cultivares e condições de cultura testados.

Segundo PERES (2002), quando um explante falha em desenvolver organogênese *in vitro*, essa falha normalmente se dá na etapa de aquisição de competência. Porém, pouco se conhece, até o momento, sobre os mecanismos envolvidos na aquisição de competência para organogênese (KERBAUY, 1999).

A formação de calos e raízes nos segmentos de limbo de ambos os cultivares testados foi observada 21 dias após a inoculação dos explantes nos respectivos meios de cultura iniciais.

Em explantes obtidos a partir de segmentos de limbo do cv. Klabat observou-se formação de calos em 45% dos explantes induzidos em meio contendo 0,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP (M0,5) e em 62% dos explantes induzidos em meio contendo 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP (M1). Entretanto esta diferença não foi estatisticamente significativa. Já no meio controle, sem adição da citocinina, em 18% dos explantes foram induzidas raízes via organogênese direta, sendo que o restante dos explantes não apresentou nenhum tipo de resposta morfogênica (Figura 1).

Em contrapartida, em explantes obtidos a partir de folhas do cultivar Gold Strike, observou-se menores percentuais de formação de calos; em 25% dos explantes induzidos em meio contendo 0,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP e em 43% dos explantes induzidos em meio contendo 1,0mg L<sup>-1</sup> de BAP, sendo que esta diferença foi estatisticamente significativa. Já no meio controle, sem adição da citocinina, como na cultivar

anterior, a maioria dos explantes não apresentou nenhum tipo de resposta morfológica (Figura 2).

Comparando-se as Figuras 1 e 2, observa-se que em ambos os cultivares testados, somente foram induzidas raízes no meio controle, demonstrando que este tipo de morfogênese é aparentemente favorecida pela ausência total de reguladores de crescimento no meio de cultura. Cabe ressaltar que este tipo de morfogênese não é desejável nesta etapa do processo de micropropagação, uma vez que ainda não há formação de gemas.

Estes resultados confirmam que para a indução morfológica dos explantes é necessária a adição de citocinina ao meio de cultura, sendo que a concentração de 1,0 mg L<sup>-1</sup> foi a que levou aos melhores níveis de resposta em ambos os cultivares testados. Mesmo assim, a eficiência de indução, em média, ficou abaixo de 50% dos explantes submetidos aos tratamentos. Este resultado demonstra que novos testes devem ser realizados a fim de investigar a eficiência de concentrações mais altas de BAP.

Em relação aos genótipos testados, comparativamente, o cv. Gold Strike mostrou-se mais recalcitrante à indução, embora esta diferença não tenha se mostrado estatisticamente significativa.

Na segunda etapa do experimento a formação de calos intensificou-se para o cv. Klabat, principalmente nos meios

com 1,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0,03 mg L<sup>-1</sup> das auxinas AIB ou ANA. A formação de raízes intensificou-se nos meios controle e com 0,5 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0,03 mg L<sup>-1</sup> ANA (Figura3).

Tabela 1 - Resposta morfológica em explantes foliares de dois cultivares de calanchoe, após cinco semanas em cultura.

Cultivar	Meio de cultura	N*	Nº de explantes com calos	Nº de explantes com raízes	luz
	M0	19	5	0	SIM
	M0,5	22	0	0	SIM
	M1	7	0	0	SIM
	M0	24	0	0	NÃO
	M0,5	22	0	0	NÃO
	M1	23	0	0	NÃO
	M0	24	9	12	SIM
	M0,5	24	4	5	SIM
	M1	24	20	1	SIM
	M0	13	8	2	NÃO
	M0,5	24	6	0	NÃO
	M1	4	0	0	NÃO

\* número inicial de explantes (n) = 24

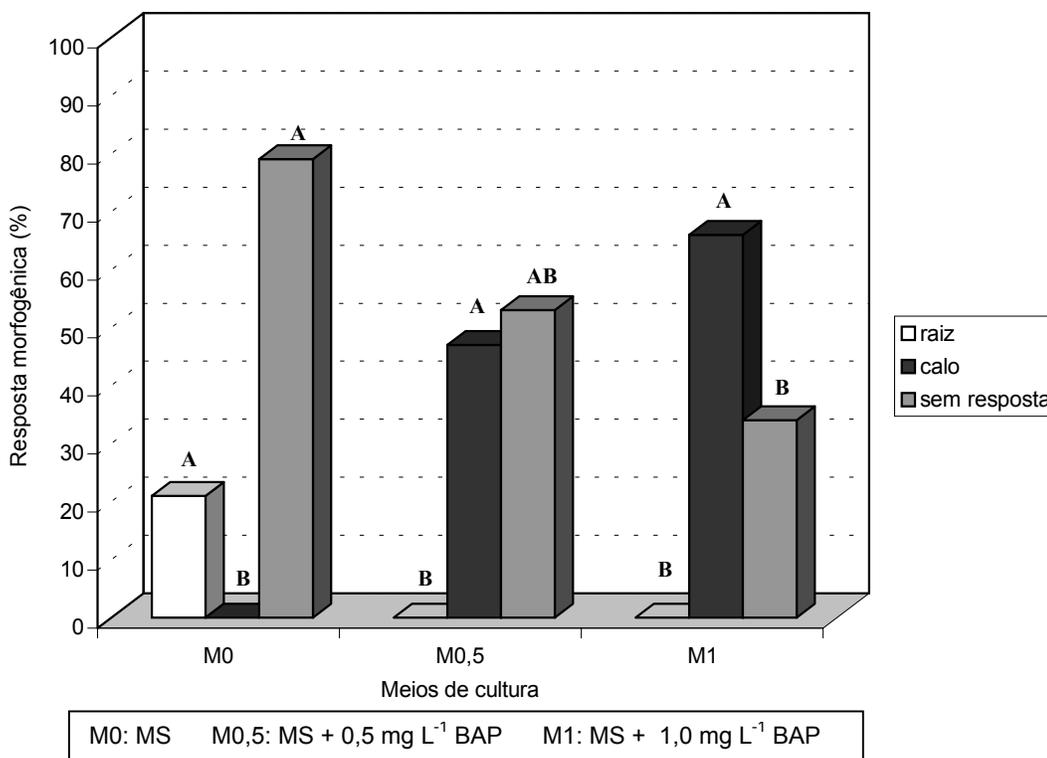


Figura 1 - Percentual de resposta morfológica em segmentos de limbo de calanchoe cv. Klabat, cinco semanas após o início do experimento. Letras diferentes sobre barras de mesmo padrão indicam diferença significativa segundo o Teste de Duncan ( $\alpha=0,05$ ).

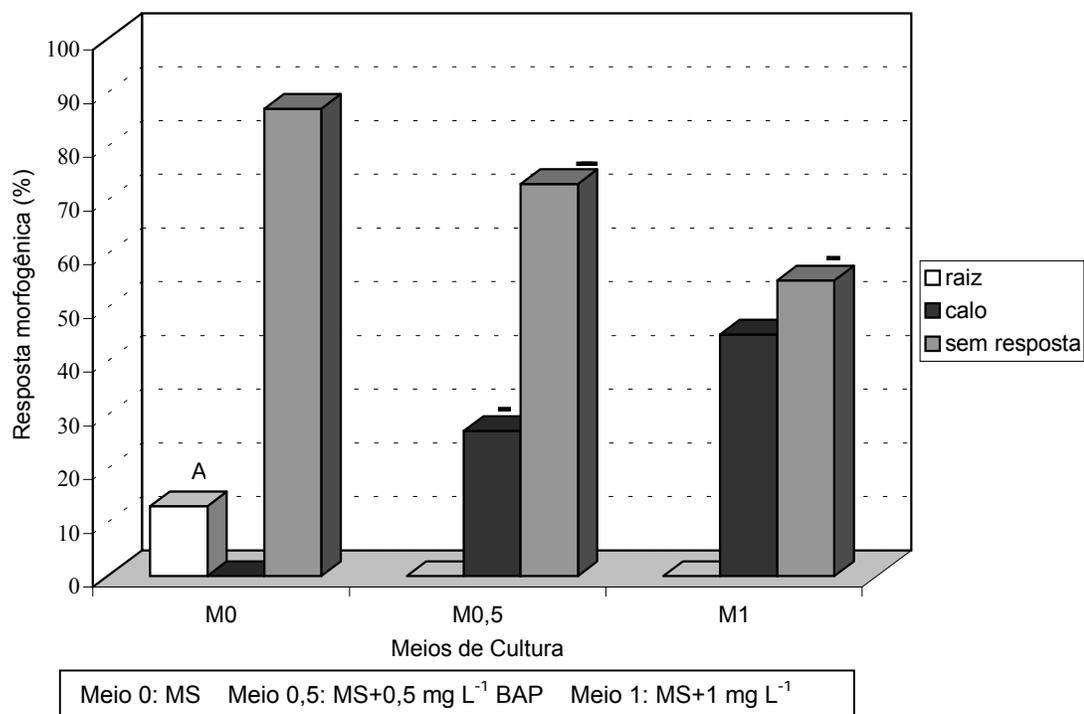


Figura 2 - Percentual de resposta morfológica em segmentos de limbo de *Kalanchoe* cv. Gold Strike, cinco semanas após o início do experimento. Letras diferentes sobre barras de mesmo padrão indicam diferença significativa segundo o Teste de Duncan ( $\alpha=0,05$ ).

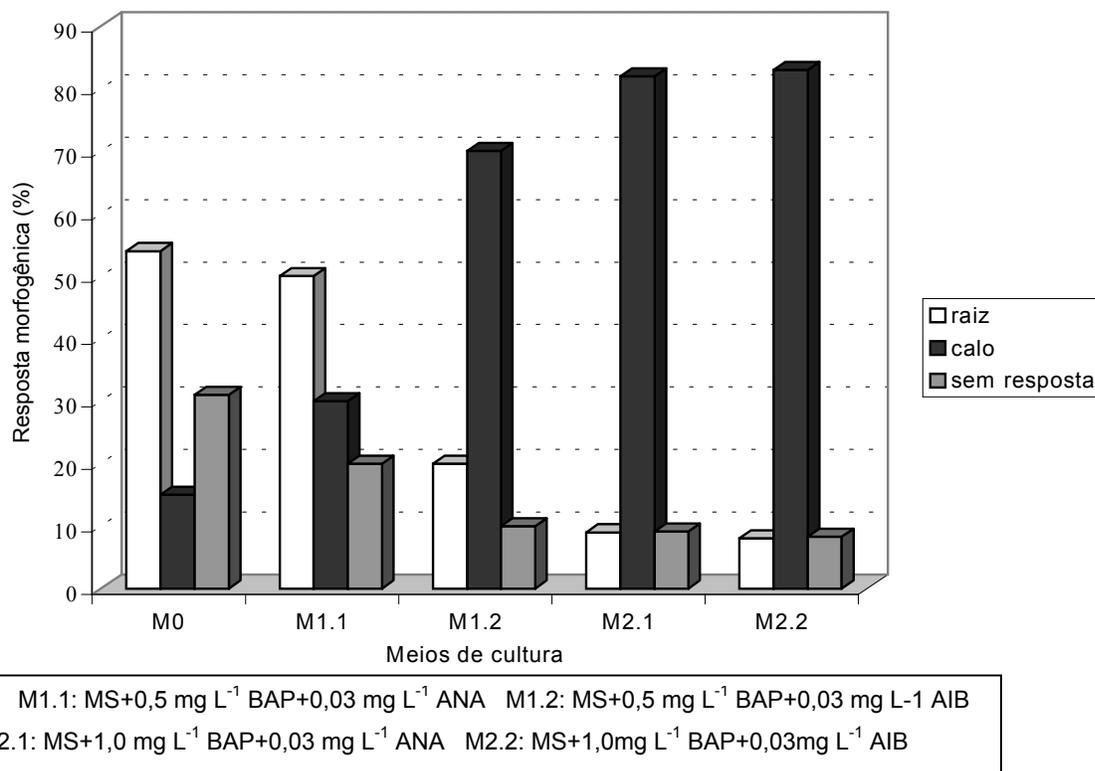


Figura 3 - Percentual de explantes foliares do cv. Klabat com resposta morfológica, duas semanas após a transferência para os respectivos meios da etapa 2 do experimento.

Já para o cv. Gold Strike, a formação de calos intensificou-se principalmente nos explantes submetidos ao meio com 0,5 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0,03 mg L<sup>-1</sup> ANA (Figura 4).

A partir de 60% dos calos induzidos em explantes foliares do cv. Klabat submetidos aos meios 1.2, 2.1 e 2.2, originaram-se gemas aéreas adventícias. Em média, foram obtidas nove gemas a partir de cada explante. Noventa e oito

por cento das gemas transferidas para meio de enraizamento, induziram vigorosas raízes após 10 dias em meio ½ MS suplementado com AIB e carvão ativado. Os outros 2% foram perdidos devido à contaminação fúngica. Todas as plantas enraizadas foram transferidas para solo e aclimatadas durante 14 dias em câmara úmida, com 100% de sobrevivência.

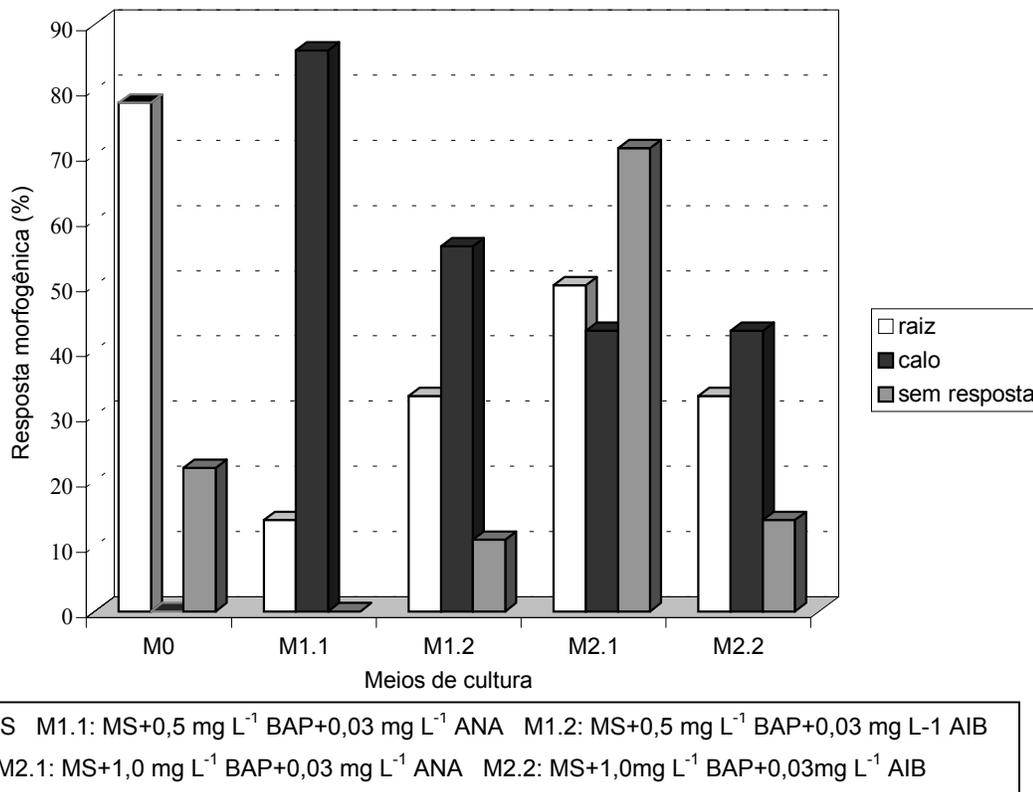


Figura 4 - Percentual de explantes foliares do cv. Gold Strike com resposta morfológica, duas semanas após a transferência para os respectivos meios da etapa 2 do experimento.

Não foi obtida nenhuma gema aérea adventícia a partir de explantes do cv. Gold Strike, o que confirma a recalcitrância deste material genético e a influência do genótipo nos níveis de resposta morfológica desta espécie.

Os dados obtidos demonstram que é possível regenerar plantas de calanchoe através da técnica da micropropagação. Mudanças viáveis, com 5 cm de altura e 10 folhas, foram obtidas num prazo de 3,5 meses.

Entretanto o método ainda não apresenta viabilidade para ser implementado na produção de mudas em larga escala, principalmente devido a dois fatores: há influência do genótipo, sendo assim, nem todas as cultivares são possíveis de serem micropropagadas; o tempo necessário para a obtenção de mudas através da micropropagação foi maior que o necessário para a propagação vegetativa convencional (segundo informações dos produtores).

Sendo assim, os experimentos nesta área deverão continuar e ser aprofundados com o objetivo de aumentar a eficiência do processo, reduzindo o tempo necessário para a obtenção de mudas e testando novas formulações de meio de cultura que permitam induzir organogênese num maior número de materiais genéticos.

## CONCLUSÕES

A presença de luz foi fundamental para a indução morfológica dos explantes para ambos os genótipos testados.

Nenhuma das condições de cultura testadas induziu a organogênese direta, sendo que a formação de gemas aéreas adventícias foi precedida da formação de calos em 100% dos casos.

Houve influência do genótipo sobre a resposta à cultura *in vitro*, sendo que o cultivar Gold Strike mostrou ser recalcitrante quando comparado ao cultivar Klabat.

A indução morfológica dos explantes foi dependente da presença de BAP no meio de cultura (1 mg L<sup>-1</sup>) e a multiplicação de calos e formação de gemas foi obtida com suplementação tanto com a auxina AIB quanto com ANA (0,03 mg L<sup>-1</sup>).

## AGRADECIMENTOS

À FAPERGS pelo apoio financeiro através do programa Recém-doutor (Processo nº 00/0047.4) e à UNISC pela

concessão de bolsas de Iniciação Científica e apoio financeiro, através dos programas PUIIC e FAP, respectivamente.

#### ABSTRACT

This study had as objective to analyze the physiologic processes involved in the establishment of protocols for *in vitro* propagation of *Kalanchoe blossfeldiana* Poelln. by organogenesis. Two cultivars were tested, *Gold Strike* and *Klabat*, using different explants: *limbo* and *petiole segments*. After disinfection, the explants were inoculated in MS medium, supplemented with BAP (0; 0.5 and 1.0 mg L<sup>-1</sup>) in the first stage and later on transferred to MS medium, supplemented with BAP (0; 0.5 and 1.0 mg L<sup>-1</sup>) combined with 0.03 mg L<sup>-1</sup> of NAA or IBA. The cultures were maintained under temperature of 25±1°C and 14h photoperiod. The morphogenic responses began 21 days after inoculation. None of the tested culture conditions induced direct organogenesis, and the formation of adventitious shoots was always preceded by callus formation. The treatment that induced larger amounts and adventitious shoots calli was: *limbo segments* of the cv. *Klabat*, cultivated in MS + 1.0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0.03 mg L<sup>-1</sup> NAA. Influence of the genotype and explant type on morphogenetic response, was observed. The cv. *Gold Strike* showed to be recalcitrant when compared to the cv. *Klabat*, the same happening with *petiole explants* for both tested genotypes.

Key-words: *micropropagation, kalanchoe, BAP, NAA.*

#### REFERÊNCIAS

- BARRUETO CID, L. P. A propagação *in vitro* de plantas. O que é isto? **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 3, n. 19, p. 16-21, 2001.
- CHRISTIANSON, M. L.; WARNICK, D. A. Organogenesis *in vitro* as a developmental process. **Hort Science**, Alexandria, v. 23, p.515-519, 1988.
- GEORGE, E.F.; SHERRINGTON, P. P. **Plant propagation by tissue culture**. Part I. England: Exegetics, 1984. 386 p.
- GONÇALVES, A.L.; MINAMI, K. Efeito de substrato artificial no enraizamento de estacas de *Kalanchoe x blossfeldiana* cv. Singapur, *Crassulaceae*. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.51, n.2, p.151-155, 1994.
- HICKS, G. S. Patterns of organ development in plant tissue culture and the problem of organ determination. **Botanical Review**, New York, v.46, p. 1-23, 1980.
- KÄMPF, A. N.; DAUT, R. S. Diagnóstico da floricultura no Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.29, n.3, p.561-563, 1999.
- KERBAUY, G. B. Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J.A.(ed.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: CBAB/EMBRAPA, 1999. p. 519-531.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Sweden, v.15, p.473-497, 1962.
- PAPAFOTIOU, M.; SCHWABE, W. W. Studies on the long-day inhibition of flowering in *Xanthium* and *Kalanchoe*. **Physiologia Plantarum**, Sweden, v. 80, n. 2, p. 177-184, 1990.
- PERES, L. E. P. Bases fisiológicas e genéticas da regeneração de plantas *in vitro*. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 4, n. 25, p. 44-48, 2002.
- STEWART, F. C. Reflections on aseptic culture. In: EVANS, D.A.; SHARP, W. R.; CHEN, Z **Handbook of plant cell culture: techniques for propagation and breeding**. New York: Macmillan, 1983. v.1, p.1-10.
- TISSERAT, B. Embryogenesis, organogenesis and plant regeneration. In: DIXON, R. A.(ed.) **Plant Cell Culture – a practical approach**. Oxford: IRL Press, 1991. p. 79-106.