

Aclimatización *ex vitro* de *Kalanchoe blossfeldiana* Poelln.

Leonardo Julio Moreno-Bermúdez, Martha Pérez, Yanet Fernández, Mariana La O, Lourdes R García

Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5,5. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54 830. e-mail: ljmoreno@ibp.co.cu

RESUMEN

Kalanchoe blossfeldiana Poelln. es una especie ornamental usada como planta para macetas y jardín. Aunque se encuentran estudios sobre su propagación por métodos biotecnológicos, no han sido descritas las condiciones para garantizar altos porcentajes de supervivencia en la fase de aclimatización de las plantas *in vitro*. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el desarrollo de plantas *in vitro* de *K. blossfeldiana* durante la fase de aclimatización. Se emplearon plantas enraizadas en un medio de cultivo sin reguladores de crecimiento. Para la plantación se usaron dos mezclas de sustrato en proporción 80: 20, humus de lombriz: zeolita y humus de lombriz: arena. Durante la aclimatización se calculó el porcentaje de supervivencia a los 7, 15 y 30 días, y se midió la altura de las plantas a los 30 días. En el enraizamiento se obtuvo un promedio de 9.8 raíces y una altura de 0.9 cm por planta. La supervivencia en la aclimatización fue 97.5% para ambos sustratos, y no hubo diferencias significativas para la variable altura de la planta. De acuerdo con los resultados, con los sustratos empleados para la aclimatización de plantas *in vitro* de *K. blossfeldiana*, pueden ser obtenidos altos porcentajes de supervivencia bajo las condiciones estudiadas en el presente trabajo.

Palabras clave: *Crassulaceae*, humus de lombriz, sustrato, zeolita

Ex vitro acclimatization of *Kalanchoe blossfeldiana* Poelln.

ABSTRACT

Kalanchoe blossfeldiana Poelln. is an ornamental specie used as a plant for pots and garden. Although are found studies on its propagation by biotechnological methods, the conditions to guarantee high survival rates in the acclimatization stage of *in vitro* plants have not been described. The aim of this work was to evaluate the development of *K. blossfeldiana in vitro* plants during the acclimatization stage. Rooted plants were used in a culture medium without growth regulators. For planting, two mixtures of substrate were used in proportion 80: 20, earthworm humus: zeolite and earthworm humus: sand. During the acclimatization the percentage of survival was calculated at 7, 15 and 30 days, and the plants height was measured at 30 days. In the rooting stage an average of 9.8 roots and a 0.9 cm height per plant was obtained. The survival in the acclimatization was 97.5% for both substrates, and there were no significant differences for the variable height of the plant. According to the results, with the substrates used for the acclimatization of *K. blossfeldiana in vitro* plants, high percentages of survival can be obtained under the conditions studied in the present work.

Keywords: *Crassulaceae*, earthworm humus, substraes, zeolite

INTRODUCCIÓN

El género *Kalanchoe* de la familia *Crassulaceae* agrupa alrededor de 130 especies de crecimiento anual o perenne. *Kalanchoe blossfeldiana* Poelln. es una especie a la cual se le atribuye gran importancia por su actividad antimicrobiana, antiinflamatoria, antidiabética

y antitumoral; aunque su mayor valor radica en su uso como planta ornamental (Kaviani *et al.*, 2014).

Algunas de las características de esta planta son la tolerancia a ambientes con escasa humedad, y la presencia durante la época de floración, de bellas y llamativas inflorescencias

de diversos colores. Debido a lo anterior, puede ser usada como planta de exterior e interior, ya sea para jardín (rocoso o arenoso) o para macetas (García-Sogo *et al.*, 2010).

K. blossfeldiana está considerada como la planta con flores para macetas más popular en Europa, donde su producción puede alcanzar 90 millones de plantas al año con una recaudación de 61 millones de euros según Royal Flora Holland (2016). En Cuba, su cultivo por parte de productores de plantas ornamentales también se ha extendido en los últimos años por ser una planta muy demandada por la población.

Para la propagación de esta especie la vía empleada tradicionalmente, es la vegetativa a partir de hojas y esquejes de tallo. Sin embargo, se ha informado que es una planta de crecimiento lento, y por ello es necesario recurrir al cultivo de tejidos para su producción rápida con fines comerciales y medicinales (Khan *et al.*, 2006).

La propagación *in vitro* constituye una alternativa eficaz en ese sentido ya que permite obtener grandes volúmenes de plantas a partir de poco material vegetal inicial, y en un menor tiempo que por la vía tradicional. En este sentido se han realizado varios estudios (Castelblanque *et al.*, 2010; Kordi *et al.*, 2013; Kaviani *et al.*, 2014). Por otro lado, existe a nivel mundial un gran interés en la obtención de nuevas variedades atractivas para el mercado, por lo cual también han sido desarrollados trabajos sobre transformación genética e hibridación entre especies (García-Sogo *et al.*, 2010; Kuligowska *et al.*, 2015).

Los resultados de los trabajos citados con anterioridad han estado enfocados fundamentalmente al crecimiento y desarrollo de las plantas durante las diferentes fases del cultivo *in vitro*. Sin embargo, no han sido especificadas las condiciones ambientales de la fase de aclimatización de plantas, por ejemplo iluminación, temperatura, humedad relativa y frecuencia de riego, necesarias para permitir el éxito en la adaptación al ambiente *ex vitro* y obtener altos porcentajes de supervivencia.

Por otro lado, como sustratos para la aclimatización *K. blossfeldiana* han sido

empleadas por varios autores diferentes mezclas de suelo, arena, turba, y perlita (Sanikhani *et al.*, 2006; Kaviani *et al.*, 2014; Góraj-Koniarska *et al.*, 2015). En este sentido, el uso de humus de lombriz y zeolita para esta fase en esta especie no ha sido informado.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el desarrollo de plantas *in vitro* de *K. blossfeldiana* durante la fase de aclimatización, con el uso del humus de lombriz, zeolita y arena como sustratos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Como material vegetal se utilizaron brotes *in vitro* de *K. blossfeldiana* en el sexto subcultivo de la fase de multiplicación, en el medio de cultivo propuesto por Kordi *et al.* (2013) con ácido naftalenacético (ANA) 0.5 mg l⁻¹ y 6-bencilaminopurina 1.0 mg l⁻¹. Para la fase de enraizamiento se utilizó un medio de cultivo compuesto por sales MS (Murashige y Skoog, 1962) 4.3 g l⁻¹, sacarosa 30 g l⁻¹, Vitaminas MS 10 ml l⁻¹ y agar® 3.8 g l⁻¹, sin reguladores de crecimiento. Al medio de cultivo se le ajustó el pH a 5.8 con NaOH 0.1 M y HCl 0.1 M. Su esterilización se realizó por método químico con la adición de Vitrofur® (116 mg l⁻¹) posterior a su elaboración y antes de ser vertido en los recipientes de cultivo de policarbamato con 500 ml de capacidad total y 60 ml de medio de cultivo.

La fase de enraizamiento tuvo una duración de 30 días, tiempo al cual se cuantificó el número de raíces y se midió la altura de las plantas (desde la base del tallo hasta el punto de emisión de las hojas) para caracterizarlas morfológicamente previo a la fase de aclimatización.

Aclimatización de plantas

La aclimatización de las plantas se realizó en casa de cultivo. Para la plantación se compararon dos tratamientos. El primero con una mezcla de humus de lombriz y zeolita, y el segundo con mezcla de humus de lombriz y arena, ambos en una proporción 80:20. La zeolita utilizada fue del tipo litonita de granulometría <4mm. El humus de lombriz fue tamizado a un tamaño de partículas de 4 mm.

La plantación se realizó en bandejas de polieturano de 150 orificios con alveolos de 4x4x7 cm. Para cada tratamiento fueron empleadas 40 plantas. Como variables para evaluar la adaptación de las plantas al ambiente *ex vitro* a los 7, 15 y 30 días se cuantificó el número de plantas vivas y se calculó el porcentaje de supervivencia, y a los 30 días se midió la altura de las plantas (cm). A partir de este último tiempo y hasta los 60 días el desarrollo de las plantas fue evaluado de manera visual; se tuvo en cuenta su supervivencia, y que su crecimiento fuera continuo, progresivo y homogéneo en cuanto al tamaño.

Durante la aclimatización las plantas fueron mantenidas a una temperatura promedio de 31 ± 2 °C (máx. durante el día) y 22 ± 2 °C (mín. durante la noche), intensidad luminosa que osciló entre 248 y 472 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperíodo de aprox. 14 h al día, humedad relativa media de 60% y frecuencia de riego de una vez al día durante 10 min entre 7:00-7:15 am.

Procesamiento estadístico

Para el análisis estadístico se empleó el programa SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*) ver. 18.0 para Windows. Para el procesamiento de los datos se comprobaron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas por las pruebas de Shapiro-Wilk y Levene, respectivamente. Debido a que los datos no cumplieron con estos supuestos, para buscar diferencias entre los tratamientos se realizó la prueba U de Mann Whitney para un intervalo de confianza del 95% ($p < 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Durante la fase de enraizamiento de las plantas *in vitro* de *K. blossfeldiana*, la emisión de raíces con el medio de cultivo empleado comenzó a observarse a partir de cinco días, para un 100% de enraizamiento a los 15 días. A los 30 días el promedio de raíces por planta fue 9.8 y su altura promedio fue 0.9 cm. Aunque la longitud de las raíces no fue medida, el sistema radical fue entre dos y tres veces la altura de la parte aérea de las plantas; además, estas crecieron de manera compacta en forma semejante a roseta (Figura 1).

Sobre el enraizamiento *in vitro* de las plantas sin la presencia de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo, se plantea que en plantas donde las raíces se regeneran espontáneamente, las auxinas endógenas producidas en el ápice del tallo se transportan basipetalmente a la superficie de corte y actúan como desencadenantes del proceso. Además, en estas plantas la aplicación de auxina exógena aumenta fuertemente el número de raíces regeneradas (De Klerk *et al.*, 1999). Lo anterior podría explicar la respuesta observada en material vegetal utilizado en el presente estudio durante la fase de enraizamiento. Como se especificó previamente, los brotes empleados estuvieron expuestos a la auxina ANA adicionada al medio de cultivo durante seis subcultivos en la fase de multiplicación. Esto pudo favorecer también la acumulación endógena del regulador de crecimiento mencionado, en los tejidos del material vegetal al momento de iniciarse la fase posterior.

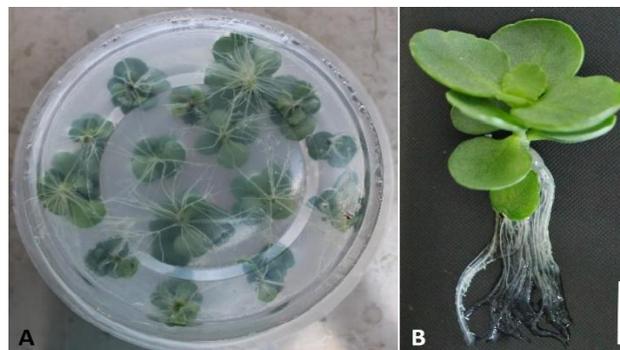


Figura 1. Plantas *in vitro* de *Kalanchoe blossfeldiana* Poelln. A: presencia de raíces a los 30 días de cultivo en medio de cultivo semisólido sin reguladores de crecimiento, B: Plantas listas para la transferencia a la fase de aclimatización (barra igual 1 cm).

Durante la fase de aclimatización se obtuvo 97.5% de supervivencia de las plantas para cada sustrato bajo las condiciones evaluadas. Al cabo de los 30 días las plantas desarrollaron un sistema radical compuesto por abundantes raíces fibrosas y su altura promedio fue 1.9 y 2.0 cm, sin diferencias significativas entre ambos tratamientos (Figura 2 A). Durante todo el período experimental (60 días) el crecimiento de las plantas fue continuo y progresivo y la altura homogénea (Figura 2 B). El porte fue compacto, con entrenudos cortos y casi al finalizar el experimento se constató la presencia de ramificaciones a partir de las yemas axilares del tallo presentes en la base de las hojas (Figura 2 C).

El enraizamiento sin el uso de reguladores de crecimiento en *K. blossfeldiana* fue logrado también por Fira y Clapa (2009) en un medio de cultivo semejante al usado en el presente trabajo, y por Pagter *et al.* (2013) quienes utilizaron una solución hidropónica solamente con macro y micro nutrientes. Estos resultados demuestran la buena respuesta morfogenética para la inducción de raíces de la especie trabajada.

Durante la fase de aclimatización los altos porcentajes de supervivencia de las plantas, su forma de crecimiento, su desarrollo homogéneo y las características de su sistema radical evidenciaron que la adaptación al ambiente *ex vitro* fue adecuada. El éxito en esta fase pudo deberse tanto a las características con las que el material vegetal procedió de la fase de enraizamiento, así como a las condiciones ambientales en las cuales se desarrolló durante la última etapa experimental.

Por otro lado, las mezclas de sustratos empleadas y la proporción de sus componentes también pudieron influir en esos resultados. La arena ha sido utilizada como parte del sustrato para favorecer el drenaje del suelo en la aclimatización de plantas del género *Kalanchoe* por Kaviani *et al.* (2014) y Góraj-Koniarska *et al.* (2015), aunque en sus trabajos estos autores no realizan una descripción de las características de las plantas estudiadas. La zeolita, aunque no se ha informado su uso con tales propósitos en la especie trabajada, sí ha sido utilizada como componente del sustrato en la aclimatización de plantas *in vitro* por autores como de Fera *et al.* (2016) en *Solanum tuberosum* L. y Valdés *et al.* (2016) en *Saccharum* spp., entre otros. Este componente de origen natural, además de mejorar la aireación de los sustratos, posee propiedades físicas que pueden mejorar la capacidad de intercambio iónico del sustrato, los contenidos de fósforo y potasio asimilables por las plantas y contrarrestar la disminución del pH del suelo. Además, es capaz de retener los nutrientes y aportarlos lentamente de acuerdo con la demanda de las plantas (Mayea, 1995).

La respuesta mostrada por las plantas durante el período de aclimatización también pudo estar influenciada por el humus de lombriz empleado como materia orgánica en el sustrato. Según Jiménez-Terry *et al.* (2013), entre las características generales de este componente están los altos contenidos de nitrógeno y otros elementos minerales que garantizan la asimilación y acumulación de sustancias de reserva. Se ha demostrado que este material aporta nutrientes que favorecen un crecimiento rápido de las plantas que se cultivan en él (Santos *et al.*, 2010), y además se refiere que es muy apropiado para cualquier tipo de cultivo (Escobar, 2013).



Figura 2. Plantas de *Kalanchoe blossfeldiana* Poelln. aclimatizadas. A: Altura de la planta y desarrollo del sistema radical a los 30 días. B: homogeneidad en el tamaño de las plantas a los 60 días. C: desarrollo de ramificaciones a partir de yemas axilares del tallo en la base de las hojas a los 60 días.

Resultados favorables en la aclimatización de plantas con el uso de mezclas de humus de lombriz y zeolita como sustratos, también han sido informados por Jiménez-Terry *et al.* (2013) en *Solanum tuberosum* L. y Barbón *et al.* (2014) en *Coffea arabica* L. cv. 'Caturra rojo'. Los resultados del presente trabajo constituyen el primer informe de que ambos materiales pueden ser usados para la aclimatización *ex vitro* de *K. blossfeldiana*. Con ellos es posible lograr durante esta última fase del proceso de micropropagación, plantas de calidad evidenciado por la respuesta mostrada durante la adaptación a las condiciones *ex vitro*.

CONCLUSIONES

Plantas *in vitro* de *K. blossfeldiana* pueden aclimatizarse *ex vitro* con alto porcentaje de supervivencia y adecuado desarrollo con el empleo de mezclas de humus de lombriz: zeolita (80:20) y humus de lombriz: arena (80:20).

Conflicto de intereses

Los autores no declaran conflicto de intereses.

REFERENCIAS

- Barbón R, Nguyen HT, Capote A, de Feria M, Pérez A, Rivero L, Leiva-Mora M, Hurtado O (2014) Efecto de mezclas de sustratos en la fase de conversión de plantas de *Coffea arabica* L. cv. 'Caturra rojo' obtenidas por embriogénesis somática. *Biotecnología Vegetal* 14(4): 205-213
- Castelblanque L, García-Sogo B, Pineda B, Moreno V (2010) Efficient plant regeneration from protoplasts of *Kalanchoe blossfeldiana* via organogenesis. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 100(1): 107-112; doi: 10.1007/s11240-009-9617-8
- De Feria M, García-Águila L, Hurtado O, Chamizo M, Alvarado-Capó Y, La O M, Rodríguez M, Pérez M, Rodríguez M, Pérez B, Sarría Z, Fernández O, Castillo J (2016) Producción de minitubérculos de cuatro variedades cubanas de papa en casa de cultivo con sustrato de zeolita. *Biotecnología Vegetal* 16(4): 257-260
- De Klerk GJ, van der Krieken W, Jong JC (1999) Review the formation of adventitious roots: new concepts, new possibilities. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 35(3): 189-199; doi: 10.1007/s11627-999-0076-z
- Escobar A (2013) Usos potenciales de humus (abono orgánico lixiviado sólido) en la empresa Fertilombriz. *Revista Lasallista De Investigación* 10(1): 75-90
- Fira A, Clapa D (2009) *Ex vitro* acclimation of some horticultural species in hydroculture. *Bulletin UASVM Horticulture* 66(1): 44-50
- García-Sogo B, Pineda B, Castelblanque L, Antón T, Medina M, Roque E, Torresi C, Pío BJ, Moreno V, Cañas LA (2010) Efficient transformation of *Kalanchoe blossfeldiana* and production of male-sterile plants by engineered anther ablation. *Plant Cell Report* 29(1): 61-77; doi: 10.1007/s00299-009-0798-8
- Góraj-koniarska J, Stochmal A, Oleszek W, Motdoch J, Saniewski M (2015) Elicitation of anthocyanin production in roots of *Kalanchoe blossfeldiana* by methyl jasmonate. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 57(1): 1-8; doi: 10.1515/abcsb-2015-0007
- Jiménez-Terry F, Agramonte D, Pérez M, Pons M, Rodríguez M, La O M, Hurtado O, Pérez A, Leiva-Mora M (2013) Efecto del sustrato sobre la producción de minitubérculos de papa en casa de cultivo a partir de plantas *in vitro*. *Biotecnología Vegetal* 13(3): 169-180
- Kaviani B, Hashemabadi D, Kordi M (2014) The Effect of Different Concentrations of Plant Growth Regulators on Micropropagation of *Kalanchoe blossfeldiana* cv. White. *Journal of Ornamental Plants* 4(2): 101-106
- Khan S, Naz S, Ali K, Zaidi S (2006) Direct organogenesis of *Kalanchoe tomentosa* (*Crassulaceae*) from shoot-tips. *Pakistan Journal of Botany* 38(4): 977- 998
- Kordi M, Kaviani B, Hashemabadi D (2013) *In vitro* propagation of *Kalanchoe blossfeldiana* using BA and NAA. *European Journal of Experimental Biology* 3(1): 285-288
- Kuligowska K, Lütken H, Christensen B, Müller M (2015) Quantitative and qualitative characterization of novel features of *Kalanchoe* interspecific hybrids. *Euphytica* 205(3): 927-940; doi: 10.1007/s10681-015-1441-0

- Mayea S (1995) Evaluación del rendimiento de plantaciones de papa en suelos con aplicaciones de humus de lombriz. *Centro Agrícola* 2(1): 24-29
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15(3): 473-497; doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Pagter M, Petersen KK, Kjaer KH (2013) Direct and indirect effects of shoot- and/or root-chilling stress on growth, photosynthesis, and osmotic root water uptake in *Kalanchoe blossfeldiana* Poelln. 'Molly'. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 88(5): 571-579
- Royal Flora Holland (2016) Product Activiteitenplan Kalanchoë 2016. Disponible en: <https://www.royalfloraholland.com/media/5120420/Productactiviteitenplan-Kalanchoe-2016.pdf>. Consultado 09/12/2017
- Sanikhani M, Frello S, Serek M (2006) TDZ induces shoot regeneration in various *Kalanchoe blossfeldiana* Poelln. cultivars in the absence of auxin. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 85(1): 75-82; doi: 10.1007/s11240-005-9050-6
- Santos M, Segura M, Nustez C, López E (2010) Growth analysis and source-sink relationship of four potato cultivars (*Solanum tuberosum* L.) in the Zipaquira Town, Cundinamarca, Colombia. *Revista Facultad Nacional de Agronomía* 63(1): 253-266
- Valdés BL, Aday O, Ocaña B, Rojas L, Hernández M, Acosta-Suárez M, Gil V, González A, Rivero L, Oloriz MI (2016) Caracterización de la respuesta de cultivares de caña de azúcar a la roya naranja en casa de cultivo. *Biotecnología Vegetal* 16(1): 21-29

Recibido: 3-10-2017

Aceptado: 19-12-2017