

## Protocolo para la micropropagación de *Kalanchoe blossfeldiana* Poelln. a partir de segmentos nodales

Leonardo J Moreno-Bermúdez<sup>1\*</sup> <https://orcid.org/0000-0002-6626-0732>

Lourdes R García<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0003-1016-6939>

Martha Pérez<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0002-9983-2389>

Mariana La O<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0003-2300-2458>

Yenny Padrón<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0002-2413-7672>

Melisa María Hernández Pérez<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0002-2574-3754>

Yanet Fernández<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0002-9370-6699>

Leonardo Rivero<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0003-3627-9421>

<sup>1</sup>Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuani km 5,5. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54 830.

\*Autor para correspondencia e-mail: [ljmoreno@ibp.co.cu](mailto:ljmoreno@ibp.co.cu)

### RESUMEN

*Kalanchoe blossfeldiana* Poelln. es una planta con gran valor ornamental por su hábito de crecimiento y floración. Puede ser usada como planta para macetas y jardín, tanto en exteriores como interiores. Se considera la especie más vendida después de las orquídeas en Europa y América donde alcanza altas cifras de plantas comercializadas y de recaudaciones monetarias. Por su importancia son necesarios métodos que permitan obtener grandes cantidades de individuos a fin de satisfacer las demandas existentes en el mercado. Lo anterior pudiera ser posible a través del empleo de la biotecnología vegetal. A pesar de que se encuentran trabajos enfocados en la propagación de esta especie a nivel de laboratorio, no ha sido descrito aun una metodología para su micropropagación. En el presente trabajo se desarrolló un protocolo para la propagación *in vitro* de *K. blossfeldiana* a partir de segmentos nodales.

Palabras clave: *Kalanchoe*, plantas ornamentales, propagación *in vitro*

### Protocol for *in vitro* propagation of *Kalanchoe blossfeldiana* Poelln. from nodal segments

### ABSTRACT

*Kalanchoe blossfeldiana* Poelln. is a plant with great ornamental value due to its growth habit and flowering. It can be used as a pot plant and garden, both outdoors and indoors. It is considered the best-selling species after orchids in Europe and America, reaching high numbers of commercialized plants and monetary incomes. Due to their importance, methods for obtaining large numbers of individuals, in order to satisfy the existing demands on the market are necessary. This could be possible through the use of plant biotechnology. Although there are studies focused on the propagation of this species at the laboratory level, a methodology for its micropropagation has not been described yet. In the present work, a protocol for *in vitro* propagation of *K. blossfeldiana* from nodal segments was developed.

Keywords: *Kalanchoe*, *in vitro* propagation, ornamental plants

### INTRODUCCIÓN

*Kalanchoe blossfeldiana* Poelln. es una especie de planta de la familia *Crassulaceae* con alto valor ornamental. Presenta hojas carnosas (suculentas), de color verde brillante y con

bordes crenados. Sus flores abarcan una amplia gama de colores, se presentan en inflorescencias que pueden tener hasta más de 100 flores y permanecer viables durante 7-8 semanas (Love, 1980; Morton, 1981; Izumikawa *et al.*, 2007).

Por las características anteriores es una de las plantas ornamentales de interior más preferidas y comercializadas a nivel mundial. Es la especie más vendida después de las orquídeas en Europa y América. Durante las mayores subastas que se realizan en Holanda (FloraHolland), país de referencia en el comercio internacional de plantas ornamentales, cada año son vendidas grandes cantidades de esta planta. Los números de ventas pueden llegar hasta 100 millones de ejemplares con recaudaciones de hasta 69 millones de euros (Gümüp y Ellialtıođlu, 2018).

Dada la importancia de esta especie, son necesarios métodos para obtener grandes cantidades de plantas con los cuales satisfacer las demandas existentes en el mercado. En ese sentido, se han desarrollado trabajos sobre propagación de *K. blossfeldiana* tanto por la vía tradicional (Pérez *et al.*, 2010; García *et al.*, 2020) así como por biotecnología (Kordi *et al.*, 2013; Kaviani *et al.*, 2014; Nieves *et al.*, 2016).

A pesar de que se encuentran numerosos trabajos sobre cultivo *in vitro* de *K. blossfeldiana* (Gümüp y Ellialtıođlu, 2018), no ha sido referido aún una metodología que describa en detalle el proceso de obtención de plantas, desde la fase inicial de establecimiento en el laboratorio hasta la aclimatización *ex vitro*. Teniendo como base lo anterior, el objetivo del presente trabajo

fue establecer un protocolo para la micropropagación de *K. blossfeldiana* a partir de segmentos nodales.

## PROCEDIMIENTOS

I. Fase 0. Selección y preparación del material vegetal de partida

### Materiales

*Material vegetal:* El material de partida para el establecimiento del cultivo *in vitro* debe ser tomado a partir de un banco de plantas madre previamente establecido, con condiciones fisiológicas y fitosanitarias adecuadas, sin síntomas de carencias nutricionales o presencia de organismos patógenos (Figura 1 A). *Nota:* Seleccionar segmentos de tallos de *K. blossfeldiana* con varios pares de hojas entre los cuales debe existir no menos de un centímetro de separación (Figura 1 B).

Otros materiales: recipientes limpios para la colecta del material vegetal.

### Precauciones y medidas de seguridad

- Tres días antes de la colecta del material vegetal para su traslado al laboratorio, debe retirarse el riego a las plantas madre.
- Evitar el contacto directo de los segmentos de tallos con el suelo.
- Emplear guantes.
- Lavarse las manos al concluir el ensayo.



Figura 1. Material vegetal de partida para la propagación *in vitro* de *Kalanchoe blossfeldiana* Poelln. a partir de segmentos nodales. A: banco de plantas madre, B: segmento de tallo a ser seleccionado con una longitud de entrenudos  $\geq 1.0$  cm.

## Procedimiento

- Cortar los segmentos de tallos con un bisturí y colocarlos en frascos limpios con tapa y llevar al laboratorio.

II. Fase I. Establecimiento o iniciación del cultivo *in vitro*

## Materiales

**Material vegetal:** segmentos de tallos de *K. blossfeldiana* con varios pares de hojas, con no menos de un centímetro de separación entre ellos.

**Medio de cultivo:** Sales MS (Murashige y Skoog, 1962) 4.3 g l<sup>-1</sup>, Vitaminas MS 10 ml l<sup>-1</sup>, sacarosa 30 g l<sup>-1</sup>, 6-Bencilaminopurina (6-BAP) 1.0 mg l<sup>-1</sup>, Ácido Naftalenacético (ANA) 0.5 mg l<sup>-1</sup>, agar 3.8 g l<sup>-1</sup>, pH 5.8.

## Otros materiales

- Agua corriente
- Agua destilada estéril
- Algodón
- Detergente comercial
- Hipoclorito de sodio (NaOCl)
- Recipientes para la manipulación del material vegetal (placas Petri, platos metálicos)
- Recipientes de cultivo
- Vaso de precipitado de 500 o 1000 ml

## Equipos e instrumental

- Zaranda giratoria
- Bisturíes
- Cabina de flujo laminar
- Esterilizador eléctrico
- Pinzas

## Precauciones y medidas de seguridad

- Para todo el trabajo en cabina de flujo laminar debe emplearse vestuario, protector de cabello y tapaboca limpios y de uso exclusivo para esa área. Las manos deben protegerse con guantes. Las pinzas y bisturíes después de colocadas en el esterilizador eléctrico alcanzan altas temperaturas y existe riesgo de quemadura.
- Evitar el contacto de la piel y la inhalación de vapores de las soluciones de hipoclorito de sodio que pueden causar quemaduras e irritación, respectivamente.

## Procedimiento

- Seccionar los tallos con la ayuda de un bisturí por la mitad de cada entrenudo, a fin de individualizar cada nudo con un par de hojas. Una vez realizado este procedimiento la longitud del tallo por encima y por debajo del punto de inserción de las hojas en él deberá ser  $\geq$  a 0.5 cm (Figura 2).
- Lavar los explantes resultantes del procedimiento anterior con un algodón, detergente comercial y agua corriente. Debe frotarse la lámina foliar por el haz y el envés, el peciolo y el segmento de tallo por encima y por debajo del nudo. *Nota:* Todo lo anterior debe realizarse teniendo especial cuidado de no dañar y/o eliminar las yemas axilares en la base de cada hoja.
- Enjuagar los explantes con agua destilada estéril una vez realizado el lavado y depositarlos en frascos estériles.
- Añadir a los explantes contenidos en los frascos estériles una solución de NaOCl al 1% i.a (v/v) en agua destilada estéril. El volumen del líquido debe ser tres veces el volumen que ocupen los explantes dentro del frasco.



Figura 2. Segmento de tallo de *Kalanchoe blossfeldiana* Poelln. con dos pares de hojas, para ser desinfectado y utilizado como explante inicial en la fase de establecimiento del cultivo *in vitro*.

- Mantener los frascos con los explantes y la solución de NaOCl en agitación constante en una zaranda giratoria por diez minutos a 90 rpm aproximadamente.
- Eliminar la solución desinfectante por decantación dentro de la cabina de flujo laminar, una vez transcurrido ese tiempo.
- Enjuagar tres veces con agua desionizada estéril.
- Colocar los explantes en los recipientes para la manipulación del material vegetal (platos metálicos, placas Petri), y cortar con el bisturí los extremos superior e inferior del tallo dañados por el NaOCl.
- Colocar los explantes en los recipientes con el medio de cultivo (preferiblemente un explante por frasco de cultivo).
- Colocar los recipientes en cámara de crecimiento a  $27 \pm 2$  °C y luz solar.

*Nota:* Transcurridos 28 días del establecimiento *in vitro*, a partir de las yemas axilares de la base de cada hoja del explante se habrán desarrollado brotes de tallos con varios pares de hojas (Figura 3). A partir de estos brotes se iniciará la siguiente fase de multiplicación.

### III Fase II. Multiplicación *in vitro*

#### Materiales

*Material vegetal:* Brotes *in vitro* de *K. blossfeldiana*.

*Medio de cultivo:* Sales MS  $4.3 \text{ g l}^{-1}$ , Vitaminas MS  $10 \text{ ml l}^{-1}$ , sacarosa  $30 \text{ g l}^{-1}$ , 6-Bencilaminopurina (6-BAP)  $1.0 \text{ mg l}^{-1}$ , Ácido Naftalenacético (ANA)  $1.0 \text{ mg l}^{-1}$ , agar  $3.8 \text{ g l}^{-1}$ , pH 5.8.

Otros materiales: recipientes para la manipulación del material vegetal (placas Petri, platos metálicos u otro).

#### Equipos e instrumental

- Bisturíes
- Cabina de flujo laminar
- Esterilizador eléctrico
- Pinzas

#### Precauciones y medidas de seguridad

Para todo el trabajo en cabina de flujo laminar debe emplearse vestuario, protector de cabello y tapaboca limpios y de uso exclusivo para esa área. Las manos deben protegerse con guantes. Las pinzas y bisturíes después de colocadas en el esterilizador eléctrico alcanzan altas temperaturas y existe riesgo de quemadura. Evitar el contacto de la piel.

#### Procedimiento

- Seccionar los brotes formados durante la fase de establecimiento (Figura 4 A) transversalmente en el punto medio de cada entrenudo, de manera que se obtengan varios



Figura 3. Brotes de *Kalanchoe blossfeldiana* Poelln. a los 28 días del establecimiento *in vitro*, desarrollados a partir de yemas axilares, para iniciar la fase de multiplicación de brotes.

segmentos de tallos con un solo par de hojas (Figura 4 B), de la misma manera que fue realizado para iniciar la limpieza y desinfección del material vegetal durante la fase de establecimiento.

- Colocar los explantes en el medio de cultivo de multiplicación.
- Colocar los recipientes en cámara de crecimiento a  $27 \pm 2$  °C y luz solar.
- Realizar al material vegetal multiplicado (Figura 4 C) subcultivos cada 28 días, y para ello individualizar los explantes (Figura 4 D).

*Nota:* se pueden realizar varios subcultivos de multiplicación según los intereses de los propagadores.

#### IV Fase III. Enraizamiento *in vitro*

##### Materiales

*Material vegetal:* brotes *in vitro* de *K. blossfeldiana* procedentes de la fase de multiplicación.

*Medio de cultivo:* Sales MS  $4.3 \text{ g l}^{-1}$ , Vitaminas MS  $10 \text{ ml l}^{-1}$ , sacarosa  $30 \text{ g l}^{-1}$ , agar  $3.8 \text{ g l}^{-1}$ , pH 5.8.

Otros materiales: Recipientes para la manipulación del material vegetal (placas Petri, platos metálicos u otros).

##### Equipos e instrumental

- Bisturíes
- Cabina de flujo laminar
- Esterilizador eléctrico
- Pinzas

##### Precauciones y medidas de seguridad

Para todo el trabajo en cabina de flujo laminar debe emplearse vestuario, protector de cabello y tapaboca limpios y de uso exclusivo para esa área. Las manos deben protegerse con guantes. Las pinzas y bisturíes después de colocadas en el esterilizador eléctrico alcanzan altas temperaturas y existe riesgo de quemadura. Evitar el contacto de la piel.

##### Procedimiento

- Individualizar los brotes procedentes del medio de cultivo de multiplicación.
- Colocar los explantes en medio de cultivo de enraizamiento.

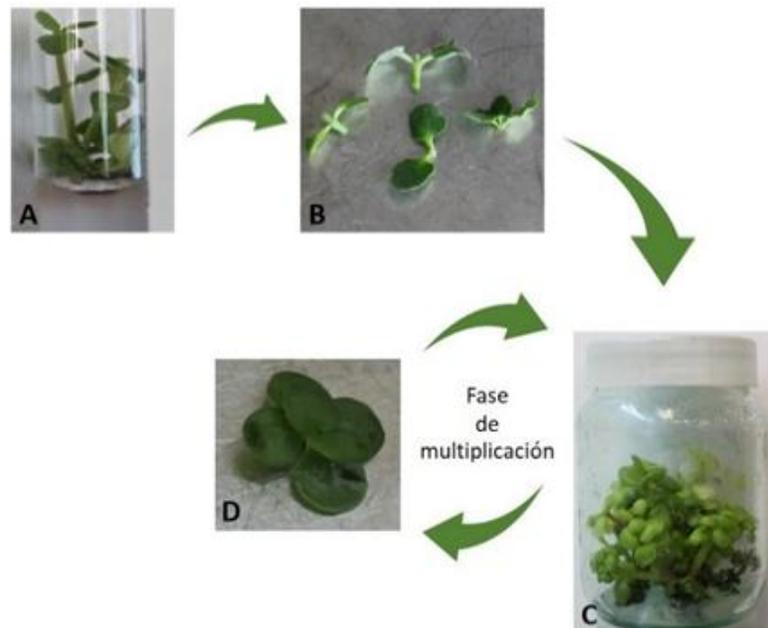


Figura 4. Esquema de la fase de multiplicación de *Kalanchoe blossfeldiana* Poelln. A: brotes formados en la fase de establecimiento *in vitro*, B: segmentos de tallo con dos pares de hojas para iniciar la fase de multiplicación, C: brotes *in vitro* con 28 días de cultivo en fase de multiplicación, D: brote *in vitro* proveniente de la fase de multiplicación, individualizado para el siguiente subcultivo de multiplicación.

- Colocar los recipientes en cámara de crecimiento a  $27 \pm 2$  °C y luz solar durante 28 días.
- Transferir a condiciones *ex vitro* las plantas crecidas con un sistema radical bien desarrollado y de más de cuatro pares de hojas (Figura 5).

*Nota:* el período desde la extracción de las plantas *in vitro* de los frascos de cultivo hasta la plantación en la fase de aclimatización, no debe ser superior a 48 horas. Inmediatamente después de efectuada la extracción de las plantas de los frascos de cultivo, deben ser ubicadas en bandejas con agua limpia. El agua debe cubrir las raíces para evitar la deshidratación.

#### V Fase IV: Aclimatización

La aclimatización de plantas se realiza basado en lo propuesto por Moreno-Bermúdez *et al.* (2018).

#### Materiales

*Material vegetal:* plantas *in vitro* de *K. blossfeldiana* procedentes de la fase de enraizamiento.

*Sustrato:* materia orgánica (compost, humus de lombriz) y zeolita o arena con una proporción 80:20 (materia orgánica: zeolita o arena).

Otros materiales: Agua corriente, bandejas de polipropileno.

#### Equipos e instrumental

- Sistema de riego por aspersión.

#### Precauciones y medidas de seguridad

El sustrato a utilizar debe estar libre de semillas de plantas de otras especies y de microorganismos dañinos como pueden ser nemátodos, bacterias y hongos patógenos para la planta. Se debe emplear guantes. Lavarse bien las manos al concluir el ensayo.

#### Procedimiento

- Las plantas deben ser clasificadas de acuerdo con sus dimensiones para lograr uniformidad cuando se coloquen en la bandeja.
- Llenar las bandejas con el sustrato.
- Colocar las bandejas en casas de cultivo con regulación de la luz solar a un 80% a través de un cobertor plástico y malla oscura o sarán.
- Regar el sustrato con agua corriente hasta que se encuentre bien humedecido.
- Colocar las plantas en el sustrato y asegurarse de que el sistema radical quede completamente introducido.

*Nota:* el riego de las plantas recién plantadas, debe efectuarse una vez al día durante 10 minutos en el horario de la mañana hasta las 9:00 am. La duración de esta fase es de 60 días. Los porcentajes de supervivencia alcanzan el 97.5% (Figura 6).



Figura 5. Planta de *Kalanchoe blossfeldiana* Poelln. enraizada a los 28 días de cultivo apta para su aclimatización.



Figura 6. Plantas de *Kalanchoe blossfeldiana* Poelln. obtenidas por cultivo *in vitro* a partir de segmentos nodales, aclimatizadas en casa de cultivo a los 60 días de plantadas.

#### CONCLUSIONES

A partir del protocolo desarrollado pueden ser obtenidos volúmenes considerables de plantas que permitan satisfacer las demandas en el mercado de la especie trabajada. A través de la metodología descrita se pueden obtener plantas homogéneas en cuanto a tamaño y características morfológicas, y con calidad fitosanitaria; aspectos que contribuyen al éxito de su comercialización.

#### AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado a través del proyecto: Mejora genética y propagación *in vitro* de especies ornamentales de interés comercial, producción de plantas y flores financiado por la Asamblea Municipal de Poder Popular de Santa Clara. República de Cuba. Los financistas no tuvieron participación en el diseño del estudio, la colecta y análisis de los datos. La decisión de publicar o la preparación del manuscrito es de la institución y el colectivo de autores del proyecto.

#### Conflicto de interés

Los autores no declaran conflicto de intereses.

#### Contribución de los autores

Conceptualización LJMB y LGR; Conservación de datos LJMB; Análisis formal LJMB y MP; Adquisición de fondos LGR y LJMB; Investigación LJMB, LGR, MP, MO, YP, MMHP,

YF, LR; Metodología LJMB y LGR; Escritura: Primera redacción LJMB, Escritura: Revisión y Edición LGR.

#### REFERENCIAS

- García RL, Hernández-Pérez M, Rivero L, Rodríguez M, La O M, Padrón Y, Mirabal D, Moreno-Bermúdez L (2020) Protocolo para la macropropagación de *Kalanchoe blossfeldiana* Poelln. *Biotecnología Vegetal* 2(2): 129-134
- Gümüs C y Ellialtioglu SS (2018) *Kalanchoe blossfeldiana* Poelln. Türünde Yapılan Doku Kültürü Arastirmalari Üzerinde Bir İnceleme. *Turkish Journal of Scientific Reviews* 11(1): 18-26
- Izumikawa Y, Nakamura I, Mii M (2007) Interspecific hybridization between *Kalanchoe blossfeldiana* and several wild *Kalanchoe* species with ornamental value. *Acta Horticulturae* 743(743): 59-65; doi: 10.17660/ActaHortic.2007.743.7
- 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
- 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

- Love JW (1980) *Kalanchoe*. En: Larson RA (Ed). Introduction to floriculture, pp. 409-434 Academic Press, New York
- Morton JF (1981) Atlas of medicinal plants of middle America. Charles C Thomas, Springfield Illinois
- Moreno-Bermúdez L, Pérez M, Fernández Y, La O M, García RL (2018) Aclimatización *ex vitro* de *Kalanchoe blossfeldiana* Poelln. Biotecnología Vegetal 18(1): 15-20
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497; doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Nieves MC, Evalour T, Aspuria ET, Bernardo E, Tayangona MAD (2016) Growth responses of *in vitro*-derived nodal sections of *Kalanchoe blossfeldiana* Poellnitz as influenced by benzylaminopurine, thidiazuron and paclobutrazol. *Asia life sciences* 25(1): 207-220
- Pérez LM, Fuentes VF, González LT (2010) Condiciones de cultivo, técnicas de propagación y distribución de las especies cultivadas con fines ornamentales en el Municipio Boyeros, Ciudad de La Habana, Cuba. *Revista del Jardín Botánico Nacional* 30(31): 187-201
- Recibido: 13-05-2020  
Aceptado: 28-07-2020
- Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo una Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial 4.0 Internacional (CC BY-NC 4.0) <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/> Está permitido su uso, distribución o reproducción citando la fuente original y los autores.