PROPAGACION *in vitro* DE VARIEDADES DE VIOLETA AFRICANA GENERADAS POR HIBRIDACION

Armando García Velázquez y Alfredo Carballo Quirós[1].

INTRODUCCION

De las plantas utilizadas como ornamentales, la violeta africana (*Saintpaulia ionantha*) es posiblemente una de las de más reciente domesticación, ya que fue a fines del siglo pasado cuando fue introducida al cultivo (Anderson, 1961). Originaria de Tanzania, fue llevada a Alemania alrededor de 1890-1893, de donde se ha distribuido a todo el mundo como una planta ornamental para interiores por lo atractivo de su follaje y floración (Kramer, 1977).

La violeta africana pertenece a la familia Gesneriaceae, que comprende varios géneros de ornamentales como las gloxinias, *Achimenes*, *Aeschyanthus* y *Alsobia*, entre otros. Las dos especies más conocidas como violeta africana son *Saintpaulia ionantha* y *S. confusa*, dentro de las cuales existen variaciones en forma de la planta y hojas así como de forma y color de las flores.

Posiblemente las actuales variedades cultivadas sean de origen híbrido entre *S. ionantha* y *S. confusa*.

Usualmente la reproducción de la violeta africana es asexuada, utilizando dos métodos: uno de ellos consiste en sumergir el peciolo de las hojas en agua potable para estimular el enraizamiento y el otro enraizando las hojas en un medio sólido, como suelo orgánico, mezclas de suelo-arena-materia orgánica o bien agrolita. De ambas formas de propagación se obtiene una planta por hoja enraizada, lo que significa un número relativamente reducido de plantas. Además, excepto por mutación somática, que no se sabe con qué frecuencia pudiera ocurrir, se comprende que las nuevas plantas son copia fiel de aquélla de la cual se tomaron las hojas.

Pocos horticultores cruzan y cultivan plantas de violeta africana proveniente de semilla, que es la manera de aumentar la variabilidad tanto en follaje como en flores.

---

[1] Profesores Investigadores del Centro de Genética, Colegio de Postgraduados, 56230 Montecillos, México.

En este escrito nos permitimos esquematizar una serie de procedimientos que producen una gran variación en la flor y que permiten multiplicar rápidamente las variantes obtenidas por medio de la hibridación, combinada posteriormente con las técnicas de cultivo *in vitro* (Figura 1).

Actividad	Tiempo
Cruzamientos	0
Semilla F_1	4 meses
Plantas F_1 en floración	12 meses
Cultivo *in vitro*	3 meses
Floración de clones obtenidos *in vitro*	5 meses
	24 meses

Figura 1. Calendario de actividades para la obtención de "Variedades" de violeta africana (*S. ionantha*) y su multiplicación para cultivo *in vitro*.

CRUZAMIENTOS

Las anteras de las flores de violeta africana son indehiscentes, por lo que cuando el estigma es receptivo es necesario polinizarlo artificialmente. La polinización se lleva a cabo cuando el estigma se torna de color blanco brillante y ocurre secreción en la superficie estigmática. Para realizar ésta, se colectan anteras de flores recién abiertas del progenitor masculino seleccionado y con el auxilio de unas pinzas de disección se rompen para liberar el polen. Posteriormente, el polen se aplica sobre el estigma de la planta hembra. Esta operación se repite por tres días.

En virtud de la indehiscencia de las anteras, no se requiere emascular ni cubrir las flores que se utilizan como hembras, una vez polinizadas; sólo es necesario marcar las flores que fueron polinizadas y las fuentes de polen, para identificar los progenitores y las fechas de las cruzas.

Tres o cuatro meses después de las polinizaciones, las cápsulas que contienen las semillas estarán secas y pueden ser cosechadas. Cada una contendrá miles de semillas aptas para la siembra. La viabilidad de las semillas pueden mantenerse por lo menos por tres años, se les guarda en un frasco de cristal, tapado y bajo condiciones de temperatura y humedad relativa ambiente de 15 a 25°C, y 60 a 70%, respectivamente.

SIEMBRA

Como la semilla de violeta africana es muy pequeña (mide aproximadamente medio milímetro), es recomendable sembrarla en cajas de petri, colocándolas sobre dos hojas de papel filtro humedecidas hasta el punto de saturación. Se toma la cápsula, con una tijera de punta fina se le corta un extremo y entonces se esparce la semilla, procurando que quede bien distribuída. Se recomienda sembrar 100 semillas por caja de nueve centímetros de diámetro.

Entre 10 y 15 días después de la siembra se inicia la germinación, que puede prolongarse por 10 a 15 días. Las semillas que a los 30-35 días de sembradas no nacen, posiblemente no lo harán ya.

Cuando las plántulas alcanzan un tamaño de aproximadamente medio centímetro, es necesario transplantarlas en suelo, dado que agotan las reservas de la semilla. Para este primer trasplante puede emplearse cajas de plástico de 9X25X37 cm, con unos tres a cuatro centímetros de tierra tamizada y húmeda, en la que se establecerán las plántulas con la ayuda de pinzas de disección. Como las plantas son muy pequeñas, pueden ser sembradas a 4 cm en cuadro. Cada caja acomodará 5 hileras de 8 plántulas cada una (Figura 2).

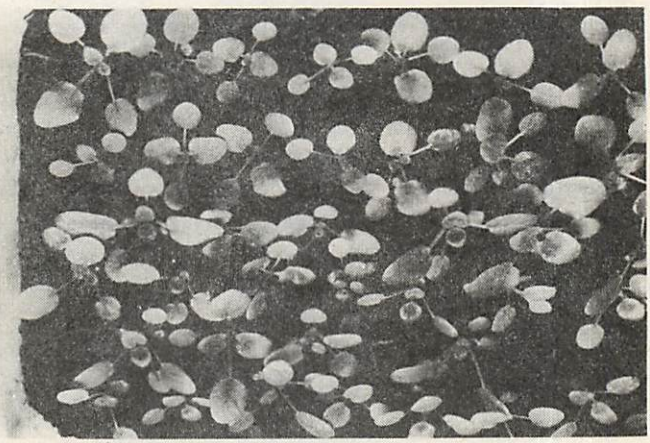


Figura 2. Plántulas de violeta africana (*S. ionantha*) de un mes de edad procedentes de semilla.

En estas cajas pueden permanecer hasta que alcanzan una longitud de aproximadamente 5 cm. Entonces, puede trasplantarse a vasos individuales de poliuretano llenos con suelo orgánico, hasta 1.5 cm del borde. Un tamaño adecuado de vaso puede ser 8.5X11.5 cm. Una vez hecho el trasplante en vasos individuales, se regará cuidadosamente cada uno y se le cubrirá con una bolsa de plástico, con el fin de que las plántulas toleren el cambio de ambiente. Gradualmente se va agujerando la bolsa, hasta que después de unos 15 días puede quitarse.

A los 8 meses se inicia la floración. En este momento se lleva a cabo la selección individual de plantas que presentan flores y follaje novedoso y atractivo, para ser propagadas mediante cultivo *in vitro* o por los métodos caseros de enraizamiento previamente descritos.

Hemos observado que en la F_1 (plantas provenientes de semilla de cruzamiento) ocurren variantes morfológicas vegetativas y reproductivas novedosas y atractivas. El follaje es aparentemente uniforme en cuanto a forma y color; aunque observado en detalle, muestra ciertas variaciones en tamaño de hoja y longitud del peciolo. El color de la flor es heredado en condición dominante; solamente un color de flor; pero observando con detalle las flores, muestran variaciones de tonalidad y de intensidad. Sin embargo, la variación más interesante es la referente al número y forma de los pétalos. En cruzas entre flores sencillas de un solo color, pero una de ellas con pétalos de borde serrado, aparecieron flores con corolas dobles y sencillas, en las que los bordes de los pétalos eran serrados o lisos. Dentro de una población de 100 plantas aparecieron cuando menos seis tipos diferentes de flores (Figura 3).

Este trabajo, reducido en sus alcances por ser meramente exploratorio, sólo tuvo como propósito un pasatiempo que como tal, no reclama conocimiento de genética para la obtención de las nuevas plantas procedentes de semilla del cruzamiento. Hasta aquí podría ser practicado por cualquier persona en su casa. Sin embargo, puede extenderse al estudio de la forma de herencia de algunos caracteres de la flor, principalmente, lo que sería de interés para aquellos que se dedican a la producción comercial de violetas africanas.

Como ya se indicó, de cada nueva planta también se puede iniciar la propagación masiva mediante el cultivo *in vitro* de una o varias hojas, sin necesidad de sacrificar la planta. Para el empleo de esta metodología, se requiere de ciertos conocimientos y de técnicas que se exponen a continuación y en las que podrían

adiestrarse quienes estuviesen interesados en la producción en gran escala de las plantas variantes, seleccionadas por su tipo más llamativo. Para información al respecto, los interesados pueden dirigirse al primer autor.

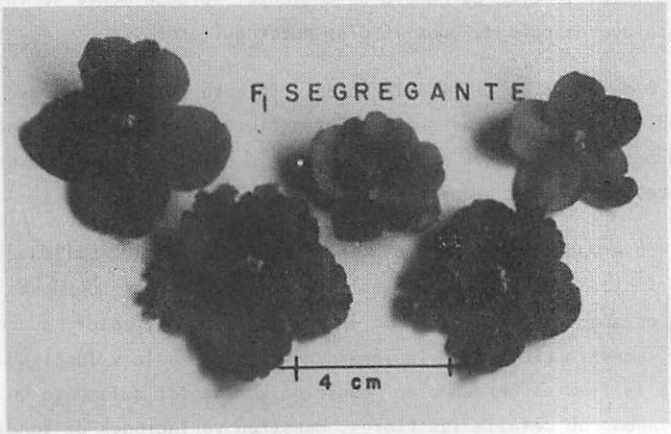


Figura 3. Segregación en flores de plantas F_1 de violeta africana.

CULTIVO *in vitro*

Una vez seleccionadas las plantas F_1 con flores o follaje novedoso, o ambos, que podrían ser consideradas como nuevas variedades, puede procederse a su reproducción *in vitro* para producción en escala comercial.

Start y Cummings (1976), Cooke (1977), Bilkey *et al.* (1978) han ensayado la propagación de violeta africana (*S. ionantha*), cultivando *in vitro* segmentos de hoja y de peciolos, con buenos resultados. Aún las quimeras pueden mantenerse mediante el cultivo *in vitro* de hojas (Smith y Norris, 1983).

En nuestro trabajo hemos logrado la producción masiva cultivando segmentos de hoja y obteniendo además plantas con buena simetría en forma de roseta, utilizando la metodología que se describe a continuación:

Con la ayuda de un bisturí limpio y estéril se cortan secciones de hoja de aproximadamente 1.2 cm^2, que son colocadas inmediatamente en una caja petri con alcohol etílico (70%), dejandose ahí por un minuto. Después, se decanta el residuo de alcohol y se cambia por una solución acuosa de hipoclorito de calcio (4%), donde se dejan por 10 minutos; posteriormente se enjuagan tres veces con agua estéril y se les seca con papel filtro estéril.

Una vez secas las fracciones, se colocan de cuatro a cinco, sobre el medio de Murashige y Skoog (1962), complementado con 1.0 mg/ℓ de AIA y 10 mg/ℓ de cinetina y se incuban a 25 ± 2°C con un fotoperíodo de 16 h y con una intensidad de 1400 lux. Se recomienda utilizar frascos Gerber de 100 mℓ, en los que se coloca aproximadamente 25 mℓ del medio de cultivo.

A los 30 días de la siembra *in vitro*, en los bordes de los segmentos de hoja se observan inmuerables hojitas con tallos dimunutos. Después de 45 días de incubación se transplantan *in vitro* al mismo medio de cultivo, con las sales diluidas al 50% y sin reguladores del crecimiento. Puede utilizarse el mismo tipo de recipiente. En cada frasco se depositan 25 mℓ de medio de cultivo y secciones de 5 a 6 cm^2 de hoja, en uno o dos segmentos. El peciolo también puede utilizarse para propagar, pero es menos eficiente que la hoja. Este cambio estimula la diferenciación del sistema radical, tallo y hojas.

A los 60 días, se obtienen 70 plantas por frasco sembrado, lo que se traduce en 2800 plantas por litro de medio de cultivo.

Una vez que en el cultivo *in vitro* se han formado plántulas completas, éstas son removidas del medio de cultivo y posteriormente se enjuagan perfectamente las raíces con agua para remover residuos del medio de cultivo y finalmente trasplantan a pequeños vasos de poliuretano conteniendo suelo orgánico esterilizado. El enjuage de las raíces tiene como fin evitar el desarrollo de enfermedades, especialmente las causadas por hongos, que podrían matar las plantas jóvenes.

Las plantas establecidas en los vasos de poliuretano, son regadas con la solución de los minerales del medio de cultivo de Murashige y Skoog diluída al 25% y se cubren con una bolsa de polietileno. Esta bolsa se va perforando cada semana hasta llegar a su eliminación. Este manejo, las va adaptando gradualmente a un ambiente menos húmedo.

Estas plantas mantenidas en lugar fresco e iluminado, inician su floración a

los cinco meses del trasplante y la mantienen hasta por cuatro meses.

Este sistema de propagación *in vitro* permite una producción de miles de plantas en un plazo corto (60 días), a partir de un número reducido de hojas (4 a 5) de la planta seleccionada. Las plantas resultantes son de excelente calidad ya que tienen una buena simetría, que es uno de los aspectos valiosos de las plantas de violeta africana bien formada. Según la Asociación Americana de Violeta Africana (Kramer, 1977), la simetría alcanza 30 de 100 puntos posibles y es una de las características difíciles de lograr.

Como se aprecia en la Figura 1, con la combinación de cruzamientos y cultivo in vitro, en un plazo de aproximadamente dos años es posible obtener formas recombinantes novedosas, que da origen a nuevas variedades, que además pueden ser multiplicadas en forma comercial.

Cruzamientos planeados entre nuevas variantes de planta, de flor o de ambas, permitirá investigar las posibilidades de combinar características cada vez más atractivas en nuevas variedades, que serían entonces multiplicadas *in vitro*.

BIBLIOGRAFIA

Anderson, E. 1961. The analysis of variation in cultivated plants with special reference to introgression. Euphytica 10: 79-86.

Bilkey, C. R., W. B. McCown, and C. A. Hildebrandt. 1978. Micropropagation of African violets from petiole cross sections. Hortscience 13: 37-38.

Cooke, C. R. 1977. Tissue culture propagation of African violets. Hortscience 12: 549.

Kramer, J. 1977. How to Grow African Violets. A sunset book. Lane Publishing Co. Menlo Park, California. 80 p.

Murashige, T., and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15: 473-497.

Smith, R. W., and R. E. Norris. 1983. *In vitro* propagation of African violets chimeras. Hortscience 18: 436-437.

Start, D. N., and B. G. Cummings. 1976. *In vitro* propagation of *Saintpaulia ionantha* Wendl. Hortscience 11: 204-206.

La Sociedad Mexicana de Fitogenética agradece a la Productora Nacional de Semillas, el apoyo brindado para la impresión de este número de la revista GERMEN