

78
87

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO.

PROPAGACION MASIVA "IN VITRO" DE DOS CULTIVARES
DE VIOLETA AFRICANA (Saintpaulia ionantha, Wendl).

Fac. Ciencias, Biología 1981

T E S I S P R O F E S I O N A L .

MARIA LETICIA HERNANDEZ PEREZ.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

CLAVE DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

AIA	Acido indol acético.
ANA	Acido naftalen acético.
A. R.	Arena de río.
6 BAP	6 Bencil amino purina.
C. M.	Cuadrado medio.
DMS	Diferencia mínima significativa.
F. C.	"F" (Fisher) calculada.
F. V.	Fuente de variación.
G. L.	Grados de libertad.
IBA	Acido indol butírico.
K	Kinetina.
M. C.	Mezcla comercial.
M. L.	Mezcla de laboratorio.
ppm	Partes por millón.
S. C.	Suma de cuadrados.
T. + A.	Turba de pino y arena de río.
*	Diferencias significativas al 5%.
**	Diferencias altamente significativas al 1% y 5%.

PROPAGACION MASIVA "IN VITRO" DE DOS CULTIVARES
DE VIOLETA AFRICANA (Saintpaulia ionantha, Wendl.)

Contenido

Resumen

Capítulo I

Introducción

Antecedentes

- . Origen y hábitat de la violeta africana.
- . Clasificación y descripción botánica.
- . Propagación comercial.

Cultivo de Tejidos Vegetales:

- . Fundamentos e importancia.
- . Cultivo de tejidos en S. ionantha, Wendl.

Capítulo II

Trabajo Experimental

Objetivos del Trabajo.
Metodología.

Capítulo III

Resultados y Discusiones

Inducción.
Enraizamiento.
Adaptación.

Capítulo IV

Conclusiones y Observaciones Finales

Bibliografía

RESUMEN

La micropropagación de especies vegetales utilizando diversas porciones de ellas provee de la capacidad para la producción de grandes cantidades de plantas en cada cultivo, como consecuencia de la totipotencialidad de las células vegetales (Murashige, 1977).

La violeta africana (Saintpaulia ionantha, Wendl.) puede ser inducida para la formación de brotes o embriones adventicios con el uso de hojas, porciones florales, etc. (Kuckulczanica y Suszynska, 1972).

En este trabajo se realizó la propagación masiva "in vitro" de S. ionantha, mediante la manipulación de tejidos vegetales provenientes de las hojas de dos cultivares. Básicamente este proyecto se dividió en tres etapas :

a) Inducción de fragmentos de tejido foliar hacia la morfogénesis y originar plántulas en condiciones "in vitro", utilizando para este propósito las hormonas ANA y 6BAP.

b) Enraizamiento de las plántulas obtenidas en la etapa anterior empleando diferentes tipos de auxinas.

c) Adaptación de las plántulas a condiciones ambientales, es decir: su transferencia a diferentes tipos de sustratos

preparados para este fin y, una vez adaptadas, concluir su crecimiento y desarrollo hasta la floración.

CAPITULO I

INTRODUCCION

A N T E C E D E N T E S

Origen y habitat de la violeta africana

Las plantas pertenecientes a un género Saintpaulia son comunmente conocidas como violetas de Usambara o violetas africanas, las que han llegado a tomar gran popularidad en los últimos años como plantas de ornato en América y Europa. Sus ancestros viven en montañas cerca de la costa de Tanzania y Kenya. Las saintpaulias requieren de condiciones ambientales especiales, debido a que son susceptibles a la sequía, rayos solares directos y a la competencia de otras plantas. De esta manera, viven en las superficies de rocas calizas a la sombra de grandes árboles y, parece ser, que reciben humedad del agua que se filtra a través de las fisuras en las rocas (Johansson, 1978).

Una especie en particular, Saintpaulia ionantha es de gran importancia en floricultura, ya que presenta las características de florecer durante todo el año y, debido a los múltiples cruzamientos e hibridaciones que se han efectuado, es posible una gran variedad de tonalidades y formas tanto en el follaje como en las flores.

El descubrimiento de esta planta se le atribuye al Barón Walter Saint Paul en 1892 en las regiones antes citadas. Los registros no son claros respecto a si lo que se envió a Europa fueron semillas o plantas, pero de cualquier forma así se inició la propagación de la violeta africana fuera de su hábitat original. El autor del género fue el director del Jardín Botánico Real de Herrenhausen en Alemania, de apellido Wendieland (Milletti, 1966 y Kramer, 1978), quien las nombró Saintpaulia en honor a su descubridor, con la especie ionantha que significa "flores parecidas a violetas". Si bien, cuando fueron introducidas estas plantas no tuvieron efecto particular entre los floricultores, sí lo tuvieron cuando en el año de 1927 la firma de Armacost & Royston Inc. de Los Angeles, Calif. importó semillas provenientes de invernaderos ingleses y alemanes y este impacto se ha incrementado notablemente en las últimas dos décadas, aumentando esto, como consecuencia su valor económico, ya que en México, por ejemplo se han llegado a cotizar hasta en mil pesos algunos cultivares muy finos.

Clasificación y descripción botánica

A juzgar por los reportes en la literatura sobre los ejemplares de herbario, Saintpaulia ionantha, Wendl. solamente ha sido encontrada en el área del Tanga (Gundersen, 1950; Milletti, 1966; Van Pelt, 1978 y Johansson, 1978).

La colección de herbario de S. ionantha es muy escasa, ya que solamente se cuenta con algunos ejemplares en los Herbarios de Kew, Dar-es Salaam, Berlin, Hamburgo y Edimburgo, siendo en la mayoría de los casos especímenes provenientes del hábitat natural y algunos de jardines botánicos (Johansson, 1978).

Clasificación botánica

- Reino: Vegetal.
 - División: Embryophyta.
 - Subdivisión: Angiospermae.
 - Clase: Dicotyledoneae.
 - Subclase: Sympetalae.
 - Orden: Tubiflora.
 - Familia: Gesneriaceae.
 - Género: Saintpaulia
 - Especie: ionantha, Wendl.
- (Gundersen, 1950; Hutchinson, 1959 y Milletti, 1966).

Descripción botánica

Es una planta herbácea, perenne, de raíz de tipo ramificada y acaulescente.

Hojas: carnosas, insertadas en el tallo a manera de roseta, cordiformes, borde sinuado, con pubescencia en el haz que es de color más intenso que el envés. Los pecíolos son largos, carnosos, pubescentes y del color del envés.

Flores: hermafroditas, pentámeras, actinomorfas, hipóginas, agrupadas a manera de umbelas de tres a seis flores, con dos bracteolas en la base de la umbela. Cáliz: gamosépalo, pubescente, multipartido, actinomorfo de cinco sépalos. Corola: gamopétala, hipógina, con cinco pétalos o su múltiplo en las semidobles y dobles, de color azul violeta, pero debido a las múltiples hibridizaciones varían de tonalidad, exceptuando en amarillo. Androceo: con cuatro estambres perfectos, didínamos, epipétalos, las anteras de color amarillo brillante, libres y a veces unidas a los pétalos. Gineceo: ovario súpero, unilocular, con placenta parietal, marginal, con gran cantidad de óvulos; el estilo es simple y el estigma bilobado (Fig. 1).

Frutos: es un fruto seco, indehiscente, en forma de cápsula pequeña y redonda, con numerosas semillas pequeñas (Gundersen, 1950 y Hutchinson, 1959).

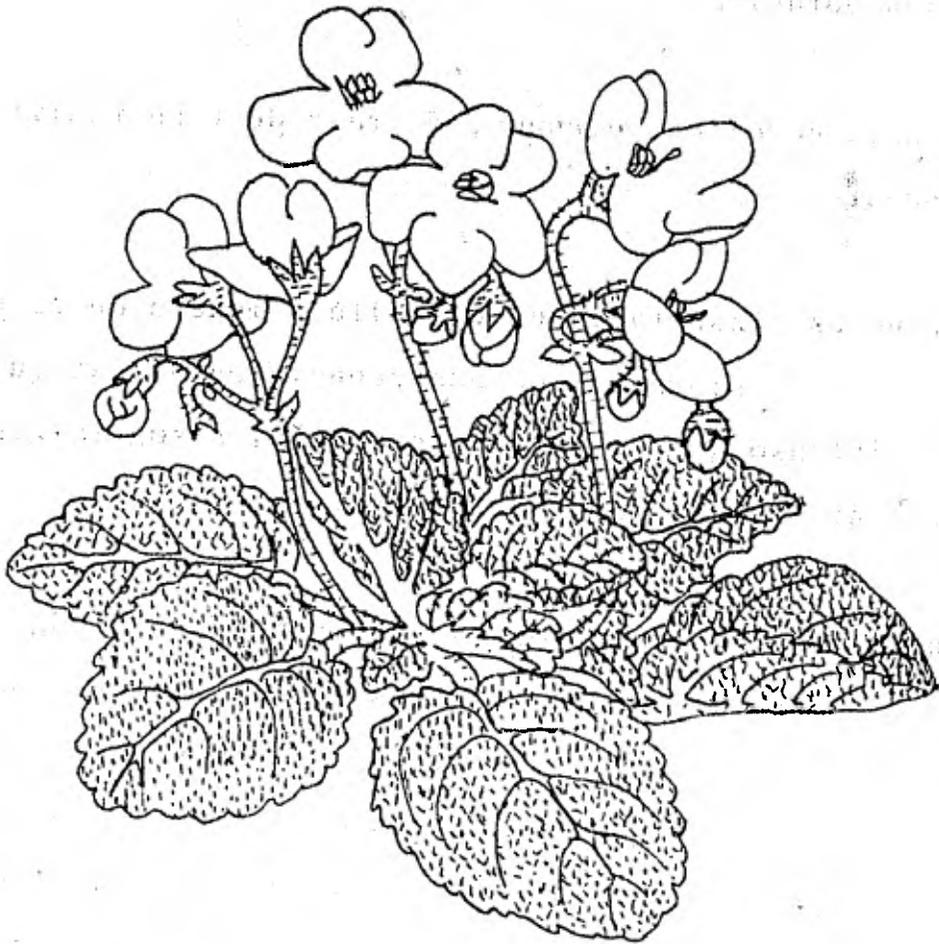


FIGURA · I

Saintpaulia ionantha, Wendl. (Tomado de Van Pelt, 1978).

Propagación comercial de violeta africana

Uno de los métodos de propagación comercial en invernadero que frecuentemente se utilizan en plantas de ornato es por medio de esquejes. En las especies que se propagan con facilidad por este método se obtienen ciertas ventajas, ya que se pueden iniciar muchas plantas partiendo de pocas, con las mismas características de la planta madre, debido a que suele reproducirse con exactitud sin variación genética alguna (Hartmann y Kester, 1980).

Los esquejes se obtienen de las porciones vegetativas de la planta como los tallos, tallos modificados (rizomas), hojas o raíces. Por lo general el tipo de esqueje que se emplea depende de la facilidad con que estos órganos enraicen, ya que muchas plantas pueden propagarse con resultados satisfactorios por medio de varios tipos de esquejes pero el más utilizado depende de su menor costo y de la fácil disponibilidad en la planta. Al escoger el material es importante usar plantas madres que estén libres de enfermedades, que sean vigorosas y productivas, para lo cual es recomendable el establecimiento de bloques de plantas progenitoras como fuente de material a multiplicar, donde se mantengan libres de plagas y en condiciones ambientales y de nutrición óptimas para garantizar buenos resultados durante su enraizamiento (Hartmann y Kester, 1980).

La violeta africana es una planta que se propaga típicamente mediante enraizamiento de esquejes de hoja ya sea en agua o arena. Para este propósito se ha recomendado el uso de hojas maduras con pecíolo de 3 cm de largo (Heinl, 1973; Kramer, 1978 y Van Pelt, 1978), y al cabo de 15 a 45 días, dependiendo del cultivar, las raíces aparecerán y posteriormente las plántulas se empiezan a formar, obteniéndose un máximo de seis plántulas por hoja enraizada (Van Pelt, 1978).

Existen también otros tipos de propagación de Saintpaulia como la individualización de los pequeños verticilos que se forman en la base de la planta y se utiliza también la forma sexual, es decir: por medio de semillas, lo que no es muy frecuente debido a que hay que llevar a cabo la polinización manualmente y el desarrollo de las semillas dura aproximadamente nueve meses (Van Pelt, 1978). Este método por lo general se utiliza cuando se desea obtener nuevos híbridos de cultivares seleccionados (Heinl, 1973).

Cultivo de tejidos vegetales

Fundamentos, usos e importancia.

El cultivo de tejidos vegetales "in vitro" es una metodología que durante los últimos años se ha desarrollado notablemente.

Los trabajos sobre esta línea fueron iniciados por el intento fallido de Haberlandt en 1898, quien utilizó células aisladas de parénquima y epidermis de diversas plantas y declaró al respecto: "En mis cultivos, la división celular nunca fue observada. Será el problema para los experimentos futuros el descubrir las condiciones bajo las cuales se producirá la proliferación celular" (citado por Street, 1977).

Durante los siguientes 30 años muy poco se progresó en esta área, ya que solamente se logró mantener vivas a las células durante períodos prolongados, pero no su multiplicación para producir agregados celulares (Wareing y Phillips, 1978) y no fue sino hasta la década de los treinta cuando P.P. White logró cultivar exitosamente raíces de tomate "in vitro" y demostró que mediante el suministro de los nutrientes apropiados, tales tejidos pueden crecer y diferenciarse en raíces normales. Hacia fines de esa década, Nobecourt y Gautheret en Francia, reportaron el crecimiento por tiempos

indefinido de callo proveniente de raíces de Daucus carota en medios asépticos, utilizando soluciones de sales minerales, glucosa, tiamina, hidrociorhidrato de cisteína y ácido indolacético (Wareing y Phillips, 1978 y Hartmann y Kester, 1980).

Por otra parte, White en 1937 descubrió el importante papel que juegan las vitaminas y auxinas para el crecimiento de raíces en la proliferación del procámbium de plántulas del híbrido Nicotiana glauca X N. langsdorffi y demostró la posibilidad de subcultivos repetidos en medios gelificados con agar con resultados similares a los de su trabajo de clonación en tomate.

La técnica básica del cultivo de tejidos descrita por estos pioneros ha resultado en el establecimiento de tales cultivos en muchas especies (Street, 1977). Durante el periodo de 1939-1950 el trabajo con raíces atrajo la atención del papel de las vitaminas en el crecimiento de la planta, y se avanzó en el conocimiento de la relación brote-raíz, lo que condujo a una época de interés y actividad. Los estudios de Miller y Skoog (1953) sobre la formación de yemas en explantes de tabaco llevaron al descubrimiento de la kinetina, derivado de la adenina que estimula la división celular (Street 1977). En el mismo año, Steward introdujo la utilización del endospermo inmaduro de coco como fuente de nutrimentos y siguió en sus diversas etapas el fenómeno de la embriogénesis

que ocurre durante este tipo de cultivo. Por esta época Morol y Martín (citados por Azaola, 1979), intentaron resolver el problema de virosis en dalia por lo que cultivaron meristemos apicales, obteniendo por primera vez plantas virtualmente libres de virus, basándose en el hecho de que no existe translocación de virus en los meristemos porque no presentan haces vasculares.

Otro de los aspectos que abarcan el cultivo de tejidos es la obtención de plantas haploides a partir del cultivo de anteras que fue por primera vez reportado en 1960 por Melchers y Berg, teniendo en la actualidad aplicaciones significativas en el mejoramiento genético de las plantas. También otro punto importante es el de la fusión de protoplastos mediante la disolución de la pared citoplasmática por acción enzimática - realizado por Cocking en 1960 (Street, 1977).

En años recientes la práctica del cultivo de tejidos se ha difundido notablemente debido a las múltiples ventajas y aplicaciones que aporta, entre las que tenemos:

a) La posibilidad de una propagación masiva que incrementa "n" veces el número de plantas propagadas y es factible en una gran mayoría de especies vegetales, las que en la actualidad son producidas en algunos laboratorios de investigación y a nivel comercial algunas de ellas (Holdgate, 1977; Vázquez, et al., 1977; Azaola, 1979 y Hartmann y Kester, 1980).

b) Las plantas propagadas vía cultivo aséptico resultan libres de patógenos y en algunos casos es posible obtenerlas exentas de virus (Hartmann y Kester, 1980).

c) Es viable el establecimiento de líneas puras y obtención de nuevos híbridos mediante el uso del cultivo de anteras y protoplastos (Street, 1977 y Hartmann y Kester, 1980).

d) Otra cuestión a considerar es la disponibilidad de llevar a cabo numerosos estudios sobre aspectos bioquímicos, embriogénicos y organogénéticos al nivel citológico e histológico (Thorpe, 1979), además existe la posibilidad de obtener productos secundarios como alcaloides, esteroides, vitaminas y antibióticos (Aitchinson, et al., 1977):

Cultivo de tejidos en Saintpaulia ionantha Wendl.

La violeta africana durante los últimos años se ha convertido en una planta ornamental muy popular y por lo general es propagada exhaustivamente en forma vegetativa a partir de hojas. Para esto, existe una considerable información acerca de sus cultivares, propagación e historia (Milletti, 1966; - Heinl, 1973; Kramer, 1978 y Van Pelt, 1978), no obstante, en lo concerniente a trabajos experimentales se ha hecho muy poco.

Dentro de los primeros estudios realizados, encontramos los efectuados por Naylor y Johnson (1937), sobre el estudio histológico de la reproducción vegetativa de esta planta; más tarde, Stilwell (1949), determinó el efecto de la luz fluorescente durante el crecimiento de S. ionantha; poco después, - Reed (1954) y Ehrlich (1958) establecieron el número cromosómico de esta especie como $2n = 30$. En el mismo año de 1954, - Hanchey estudió la acción de la luz fluorescente y natural durante el crecimiento vegetativo y desarrollo floral en el cultivar Orchid Wonder; después en 1956 Kohl, Kofranek y Lunt, - trabajaron con diferentes concentraciones de fertilizantes y la tolerancia a la salinidad como factores determinantes en el crecimiento; en el siguiente año, Plummer y Leopold (1957) aplicaron sulfato de adenina y kinetina en las bases de los pecíolos del cultivar Rose Pink Bouquet y establecieron su papel durante la formación de yemas.

Posteriormente, Scott y Marston (1967), estudiaron los efectos de la nebulización con diferentes temperaturas en la regeneración del cultivar Geneva Wonder a partir de hoja; - dos años más tarde, Herklotz (1969) y Hildrum y Kristoffer- sen (1969) reportaron los requerimientos de luz, temperatu- ra e intensidad luminosa durante el crecimiento vegetativo y la floración.

Durante la década pasada, el estudio de la violeta afri- cana ha tomado más impulso, ya que tenemos entre otros los trabajos realizados por Warfield (1973) y Hentrich y Berger (1974) sobre la acción de agentes mutágenos de tipo químico y los estudios de Johansson (1978) relacionados con los as- pectos ecológicos de Saintpaulia spp.

Es conveniente hacer mención que en esta época fue - cuando aparecieron los primeros reportes del cultivo de te- jidos en la violeta africana, esto se inició con los traba- jos de Kukulczanka y Suszinska en 1972, donde reportaron - la capacidad de esta planta para formar embriones y brotes somáticos a partir de células epidérmicas de tejido foliar; Rao y Morel (1973) demostraron que fragmentos de pecíolo - podían diferenciar plantas solamente cuando se inoculaba en los tejidos la bacteria causante de la agalla de la corona (Agrobacterium sp); Hughes, et al. (1975) establecieron la metodología para la obtención de plantas haploides a partir

del cultivo de anteras de esta especie; y por otra parte, - Start y Cumming (1976) y Cooke (1977), llevaron a cabo la - propagación "in vitro" utilizando pequeñas secciones de hoja de las que proliferaron brotes y observaron la presencia de plántulas no desarrolladas. Vázquez, et al. en 1977, realizaron un trabajo de organogénesis en cultivo de porciones florales y foliares de las que obtuvieron masas celulares - indiferenciadas que aumentaron notablemente en su número y posteriormente se diferenciaron en brotes y/o raíces dependiendo de la concentración hormonal empleada. El reporte más reciente es el presentado por Bilkey y Mc Crown en 1978, los que reprodujeron "in vitro" esta planta con secciones de pe cíolo.

CAPITULO II

TRABAJO EXPERIMENTAL

OBJETIVOS

La forma comercial más ampliamente utilizada del cultivo de tejidos ha sido la multiplicación clonal. Una gran cantidad de ornamentales, algunos frutales y vegetales y ciertos géneros forestales están siendo en la actualidad reproducidos comercialmente mediante el uso de esta metodología.

El principio ha sido común en todas las plantas (Murashi ge, 1974; 1977 y Bini, 1977), pero ciertas características asociadas con el explante han sido críticas en la determinación del éxito de la propagación por esta vía; por ejemplo: para cada especie o variedad hay un órgano determinante que provee los mejores explantes, la edad fisiológica del organismo, las condiciones ambientales en las que se desarrolla, etc. Y esta multiplicación debe ser acompañada por la apropiada provisión de nutrimentos y reguladores del crecimiento.

Tomando en cuenta todos estos aspectos y los mencionados en los antecedentes, se establecieron los objetivos de este trabajo que se dividió en tres fases :

I.- El establecimiento de un cultivo aséptico y lograr el desarrollo y proliferación del tejido para presentar mor-

fogénesis "in vitro" en condiciones controladas de luz y temperatura, probando diferentes concentraciones hormonales y en donde se obtuvieron inicialmente puntos de crecimiento que se transformaron en plántulas.

II.- Las plántulas obtenidas en la primera fase se llevaron a un nuevo medio de cultivo capaz de inducir una óptima formación del sistema radicular normal de esta planta y que, a la vez, permitieron el crecimiento de las pequeñas plántulas.

La optimización de la formulación de nutrimentos fue importante en ambas etapas (I y II) ya que puede haber problemas de diferente índole: como inhibiciones, excesiva formación de células indiferenciadas por lapsos prolongados, etc.

III.- En esta fase, las plántulas enraizadas fueron separadas y transferidas al suelo, siendo los objetivos en sí, el reestablecimiento del autotrofismo, la resistencia a las tensiones de pérdida de humedad y temperatura, es decir: adaptación a condiciones ambientales normales, para concluir su crecimiento y desarrollo hasta la floración.

35

... caso con un nivel obiter de ...
 a sup ...
 ...
 ... MATERIAL Y METODO

Se utilizaron para el desarrollo de este trabajo dos cultivares de violeta africana: Jugo de Uva, que posee follaje de color verde obscuro en el haz y morado en el envés, pecíolo verde claro y estrías moradas, flores moradas de tipo semi-doble. El otro cultivar recibe el nombre de San Cristóbal, cuyas hojas son de color verde intenso en ambas caras, pero en la porción adaxial presenta una mancha de color claro y los pecíolos son del mismo tono, flores azules y semidobles.

El cultivo de tejidos es una técnica que implica cierta metodología la que, para el caso de la violeta africana, es la siguiente:

Medio de cultivo

El medio de cultivo es a base de los elementos nutritivos que normalmente requiere una planta como son: macroelementos, microelementos, vitaminas, fuentes de carbono, hormonas, etc. (Street, 1977, Hartmann y Kester, 1980). Estos componentes se pueden apreciar en el Cuadro 1. Para este trabajo se utilizaron dos tipos de medio de cultivo básicamente:

a) Para la proliferación del tejido foliar en una masa celular indiferenciada que dió lugar a brotes foliares que a su vez se desarrollaron en plántulas capaces de independizarse de dicha masa y se utilizaron diferentes concentraciones de la relación ANA/6BAP (Cuadro 2).

b) Una vez separadas e individualizadas las plántulas del callo generador fue necesario transferirlas a otro medio de cultivo capaz de estimular la formación de un buen sistema radicular y se emplearon las hormonas ANA/K y auxinas (Cuadro 3); siendo posible entonces llevarlas a los diferentes tipos de suelo en condiciones ambientales normales (Start y Cumming, 1976 y Cooke, 1977).

Ambos tipos de medios fueron adicionados con agar para gelificarlos y fueron ajustados a un pH de 5.8 (Arditti y Strauss, 1979). Se vaciaron de 15 a 20 ml en frascos de vidrio refractario, se taparon perfectamente y esterilizaron durante 15 minutos a 1.45 Atm de presión y a una temperatura de 120°C.

Una vez esterilizado y enfriado el medio de cultivo, se procedió a depositar los fragmentos de tejido vegetal ya esterilizados dentro de condiciones de asepsia en la campana de flujo laminar.

Selección y esterilización del material vegetativo

Para la selección del material se tomó en cuenta el aspecto general de la planta (Kramer, 1978 y Van Pelt, 1978), es decir: debía ser sana y vigorosa para así poder evitar en lo más posible las contaminaciones. Además se hicieron pruebas en cámara húmeda en el Laboratorio de Fitopatología de la Conafrut, para determinar si las plantas en realidad estaban libres de enfermedades bacterianas y fungosas y así poder trabajar con ellas.

De éstas se eligieron las hojas procedentes del verticilo medio, o sea hojas maduras (Heinl, 1973), ya que con ellas se obtienen mejores resultados debido a que pueden resistir en proceso de la esterilización, lo que no ocurre con las jóvenes y además, no presentan problemas de senectud con las subsecuentes acumulaciones de inhibidores, pigmentos accesorios que influirían en la eficiencia de la fotosíntesis, disminución en los niveles de síntesis de DNA, RNA, proteínas y enzimas, etc. que existen en las hojas del verticilo inferior (Levitt, 1974 y Salisbury, 1978).

Las hojas excisadas fueron desinfectadas y esterilizadas de la siguiente manera:

Se lavaron con una solución jabonosa al 0.5% para remover tierra y polvo de la superficie foliar. Se enjuagaron con agua destilada y se llevaron al área del flujo laminar para su esterilización, colocándolas en una solución de hipoclorito

de calcio al 4% durante 15 minutos; transcurrido este tiempo, se enjuagaron de nuevo con agua destilada estéril para quitar residuos de calcio que pudieran quedar en el tejido; posteriormente se lavaron con alcohol étílico al 70% durante cinco minutos, se hicieron tres lavados con agua estéril y se escurrieron perfectamente, concluido este paso ya fue posible diseccionar y sembrar los fragmentos de hoja en los medios de cultivo previamente esterilizados (Cooke, 1977 y Vázquez, et al., 1977).

Corte y siembra del material vegetativo

Concluida la esterilización se procedió a fragmentar el tejido con material quirúrgico estéril, en pequeñas porciones de 1 cm^2 aproximadamente y fueron depositados en los medios gelosados. Sembrados los frascos con el tejido se taparon perfectamente.

Condiciones de crecimiento

Los frascos fueron colocados en cámaras de crecimiento cuyas temperaturas se encontraban entre los $21 \pm 2^\circ\text{C}$ con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad e intensidades luminosas de 2000 a 2500 luxes, provenientes de focos Gro-lux (Fig. 2) (Hanchey, 1954; Cathey, et al., 1978 y Van Pelt, 1978).



FIGURA · 2

Cámara de crecimiento con temperatura, intensidad lu-
minosa y fotoperiodo controlados.

El tejido permaneció en los medios aproximadamente de 30 a 40 días y al término de ese tiempo, fue transferido a un medio fresco, ya que con el tiempo los nutrimentos se van degradando y acumulando metabolitos (Yeoman y McLeod, 1973 y Nitsch 1979).

Desarrollo de brotes y raíces

Ya que aparecieron los brotes foliares y se desarrollaron en plántulas de 1.5 a 2.0 cm fueron separadas del callo subyacente e individualizadas para ser transferidas a los medios de inducción radicular y permanecer en éstos hasta que se formó un buen sistema radicular.

Por otra parte, separadas las plántulas del callo, éste fue fragmentado y resembrado en el medio para brotes y así, al término de 40 días hubo aparición de nuevos brotes, los que se convirtieron en plántulas y fueron separadas de nuevo.

Adaptación a condiciones ambientales

Cuando se formaron las raíces en las plántulas, éstas pudieron ser transferidas a las diferentes mezclas de sustratos (Cuadro 4), previamente tamizados y esterilizados (Kramer, 1978 y Van Pelt, 1978), para determinar cual fue el mejor para completar el desarrollo hasta la floración en condiciones

ambientales normales. Los sustratos se vaciaron en almácigos y se depositaron 25 plantas en cada uno, permaneciendo en las mismas condiciones de temperatura, luz y humedad relativa.

C U A D R O . I

Medio de cultivo Murashige & Skoog (1962) utilizado para la inducción de brotes en tejidos de *S. ionantha*, Wendl.

Compuestos inorgánicos		Compuestos orgánicos	
Macroelementos	mg/lt medio	FeEDTA	mg/lt medio
NH_4NO_3	1650.00	Na_2EDTA	37.30
KNO_3	1900.00	FeSO_4	27.80
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	444.00		
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370.00	Vitaminas	
KH_2PO_4	170.00	Piridoxina.HCl	0.50
		Ac. nicotínico	0.50
Microelementos		Tiamina.HCl	0.10
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.30	Glicina	2.00
$\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	8.60	Myoinositol	100.00
H_3BO_3	0.20		
KI	0.83	Hormonas	
$\text{NaMoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.25	Auxinas	
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025	Citocininas	
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025		
		Sacarosa	20000.00
		Agar-agar	8000.00

CUADRO · 2

Medio de cultivo Murashige & Skoog (1962) adicionado de diferentes concentraciones hormonales para la inducción de brotes foliares en tejidos de *S. ionantha*, Wendl.

6BAP mg/lt	ANA medio	ANA		
		0.10	0.20	0.50
0.01		1	2	3
0.10		4	5	6
0.50		7	8	9
		# de medio		

Medio #0: Testigo, sin hormonas

Tiamina HCl: 0.00 mg/lt medio y

10.00 mg/lt medio

C U A D R O · 3

Medio de cultivo Murashige & Skoog (1962) adicionado de diferentes concentraciones hormonales para la inducción radicular de plántulas obtenidas "in vitro" de *S. ionantha*, Wendl.

Primera prueba	
IBA mg/lt medio	# de medio
0.10	1
0.20	2
0.30	3
0.50	4
1.00	5
1.50	6
2.00	7
Segunda prueba	
IBA mg/lt medio	# de medio
0.10	1
0.30	2
0.50	3
0.70	4
1.00	5
1.50	6
2.00	7

Cuadro 3 (continúa)

IBA	mg/lt	medio	ANA	# de medio
0.50			0.30	9
0.50			0.50	10
0.50			0.70	11

Medio #0: Testigo, sin hormonas.

CUADRO · 4

Sustratos empleados para la adaptación a condiciones ambientales y desarrollo de plántulas de *S. ionantha*, Wendl. obtenidas "in vitro".

Componentes	Proporción	Simbología
Turba de pino + Arena de río	3:1	T. + A.
Tierra negra + Tierra de hoja + Arena de río + Agrolita	1:1:1:1	M. L. (mezcla del - laboratorio).
Mezcla comercial		M. C.
Arena de río		A. R.

RESUMEN

Introducción de la obra

El primer capítulo describe el método de síntesis de los compuestos de la serie de los derivados de la piridina, obtenidos a partir de la piridina y sus derivados. Se describen los procedimientos de síntesis y las características de los compuestos obtenidos.

CAPITULO III

Se describen los resultados de las investigaciones realizadas en el laboratorio de síntesis orgánica de la Universidad de los Andes, Bogotá, durante el año 1964.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Se describen los resultados de las investigaciones realizadas en el laboratorio de síntesis orgánica de la Universidad de los Andes, Bogotá, durante el año 1964. Se describen los procedimientos de síntesis y las características de los compuestos obtenidos. Se discuten los resultados de las investigaciones y se comparan con los obtenidos por otros autores.

R E S U L T A D O S Y D I S C U S I O N E S

Inducción de brotes

El primer signo morfológico de organogénesis fue notado después de los 16 días de cultivo, con la aparición de gran cantidad de pequeñas protuberancias o puntos de crecimiento en los fragmentos de tejido principalmente en la zona adaxial de las hojas que se encontraban en los medios que contenían hormonas, esto confirmó lo reportado por Kuckulczanka y - Suszynska (1972), en donde los brotes fueron producidos en cultivos "in vitro" adicionados con hormonas en el tejido - foliar de Saintpaulia ionantha, Wendl. (Fig. 3)

Estos brotes adventicios o somáticos son originados a partir de capas epidérmicas y subepidérmicas del tejido - (Thorpe, 1979). Según Reinhert, Bajaj y Zbell (1977) y Thorpe (1979), las células que los van a originar son pequeñas, altas en contenido citoplasmático y de núcleo denso, observándose al microscopio como conglomerados celulares en las capas superiores del tejido. Dichas células pueden presentar dos tipos de actividad: uno, que induce a la indiferenciación y a permanecer en estado de callo; y otro, en el cual se presenta una desdiferenciación parcial que conduce a la

... de inducción...
 ... de inducción...
 ... de inducción...
 ... de inducción...
 ... de inducción...



FIGURA 3

Fragmentos de tejido con diversas etapas de organogé-
 nesis en el medio I de inducción.

... de inducción...
 ... de inducción...
 ... de inducción...
 ... de inducción...
 ... de inducción...

diferenciación en brotes foliares, radicales, e inclusive en plantas completas, dependiendo todo esto de la concentración y combinación hormonal que esté presente en el medio, lo que permite que las células presenten divisiones mitóticas anticlinales y periclinales (Reinhert, et al., 1977).

Se ha mencionado el papel tan importante que juegan las hormonas (específicamente en este caso ANA y 6BAP) como aceleradores de la morfogénesis, pero cabría preguntarse qué es lo que ocurre cuando no se encuentran en el medio de cultivo dichas hormonas y se siembran fragmentos de tejido. En pruebas que se hicieron en el laboratorio se pudo observar que efectivamente el tejido inició el proceso de organogénesis, pero fue en un grado menor, tanto en la cantidad de brotes desarrollados como en el tiempo de aparición de éstos, en comparación con los que se presentaron en los medios con hormonas, es decir: el lapso de brotación se inició a partir de los 35 días de siembra y concluyó hasta los 60 días aproximadamente, con un porcentaje de 30% como máximo y después de este periodo ya no se presentó el proceso, lo cual probablemente se debió a que los tejidos contienen una cierta cantidad de hormonas endógenas, pero en algún momento este nivel decrece o se agota cuando los tejidos han sido separados de la planta, requiriendo una fuente exógena de auxinas y/o citoquininas para la división y elongación celular durante la morfogénesis y organogénesis que se lleva a cabo durante su cultivo "in vitro".

Resultados similares han sido reportados por Rao y Morel (1973), quienes inocularon en pecíolos de violeta africana la bacteria causante de la agalla de la corona Agrobacterium tumefaciens para estimular la proliferación celular y observaron que si se omitía la bacteria, no se presentaba el fenómeno, llegando a la conclusión de que los factores responsables de la organogénesis están presentes en la suspensión bacteriana utilizada.

En las tres fases de este trabajo se desarrolló un modelo experimental con el cual se hicieron dos pruebas en cada una de estas etapas; la primera fue una comparación entre los cultivares para determinar cual fue el más efectivo en lo tocante a la producción y adaptabilidad y para evaluar si se presentaron diferencias entre ellos; y la segunda, fue una comparación de los medios de cultivo y sustratos empleados en lo concerniente a su efectividad.

En la Tabla 1 aparecen las cantidades de brotes que se obtuvieron por cm^2 de tejido en los dos cultivares y se apreció que no existieron diferencias significativas entre ambos (Tabla 2). Si observamos más adelante en las Tablas 6 y 7 sobre enraizamiento y las Tablas 11 y 12 de adaptación, nos damos cuenta que tampoco hubo diferencias en ellos; esto permitió trabajar con cualquiera de los cultivares sin tener fuertes variaciones notables debido a que tuvieron respuestas similares a lo largo de las tres etapas.

En lo concerniente a los medios utilizados para la inducción de brotes, se pudo observar que hubo diferencias notables entre ellos como aparece en la Tabla 3, y a partir de ésta, se efectuó un análisis de varianza (Tabla 4) el que mostró diferencias notables en los medios. En vista de estos resultados, se procedió a aplicar la prueba de diferencia mínima significativa (DMS) para determinar las diferencias y semejanzas entre éstos. En la Tabla 5 se determinó que el medio 1 fue diferente a todos los demás en cuanto a su efectividad; en tanto que los medios 2, 5, 6, 7, 8 y 9 no mostraron diferencias significativas al 5% y tampoco en los medios restantes, siendo baja su productividad. De estos resultados, se pudo concluir que el medio 1, fue el más favorable en este estudio (Gráfica 1).

Es conveniente hacer notar que si bien en los últimos medios antes mencionados no se formaron brotes, sí hubo proliferación celular pero se diferenciaron en brotes de tipo radicular en un lapso similar; en otros medios hubo aparición de brotes, raíces e inclusive callo, pero éstos fueron formados indistintamente en la superficie del tejido, como se observa claramente en la Figura 4, esto nos indica que el balance hormonal probablemente fue determinante durante el proceso de organogénesis (Thorpe, 1979), lo cual no sirvió para los propósitos de este trabajo ya que como se mencionó en los objetivos, lo que se deseaba era obtener un mayor número de brotes foliares por fragmento de tejido. Los

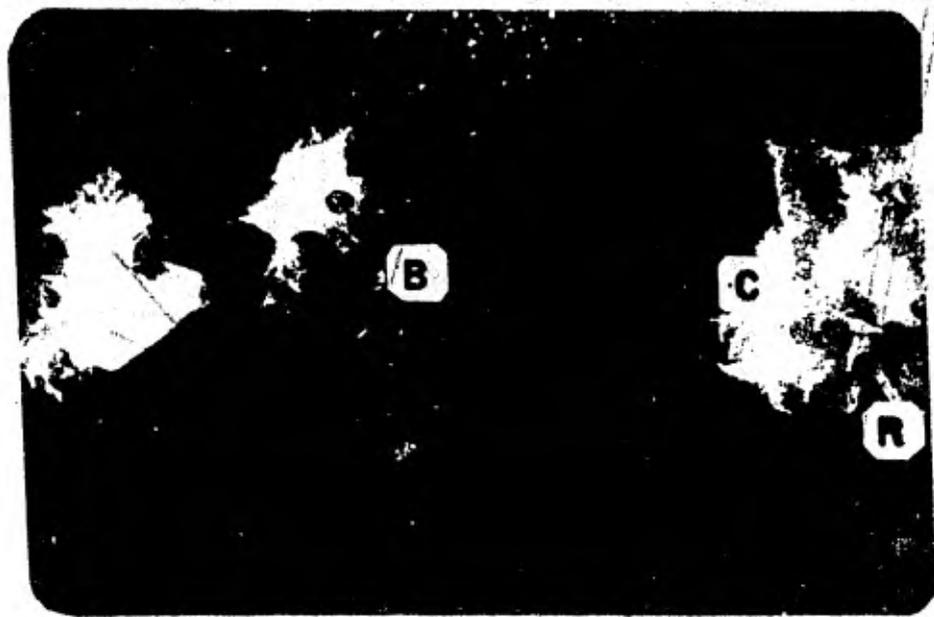
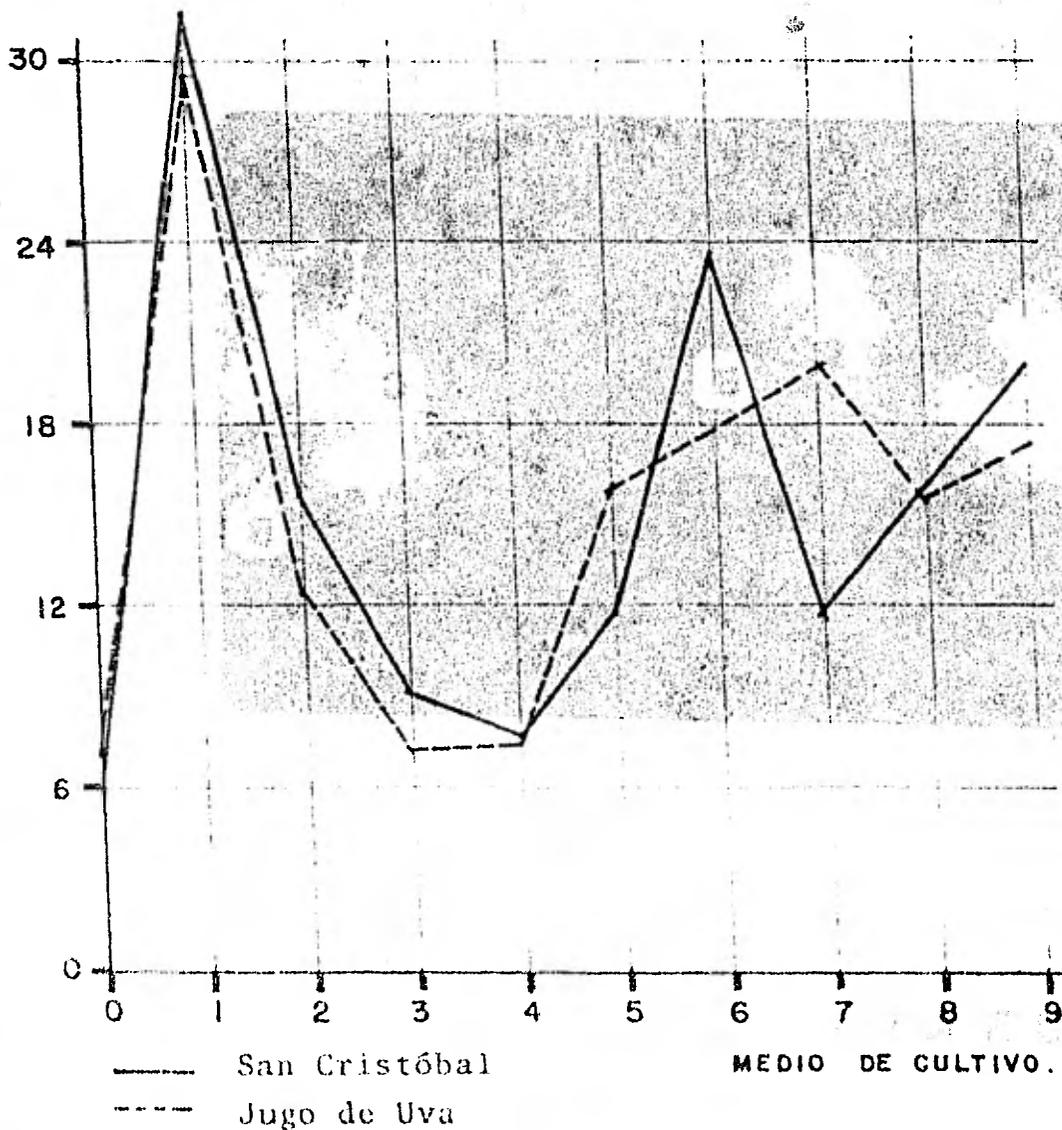


FIGURA - 4

Fragmentos de tejido mostrando desarrollo de brotes (B), raíces (R) y callo (C) en diferentes medios de inducción.

No. DE BROTES / cm.²
DE TEJIDO.



GRAFICA · I

Efecto de diferentes medios de cultivo sobre el número de brotes/cm² de tejido, inducidos a los 75 días en dos cultivares de *S. ionantha*.

que crecieron originando plántulas y después se llevaron a un medio de cultivo específico para su enraizamiento.

Enraizamiento

Desarrollados estos brotes en plántulas (de 60 a 80 días desde la primera siembra), fueron separadas del tejido que las originó, individualizadas y transferidas a los medios inductores de raíces con diferentes concentraciones hormonales (Cuadro 2) y se observó que en la primera prueba, es decir: la relación ANA/K sí hubo formación de raíces pero aparecieron a todo lo largo del pecíolo siendo raíces de tipo adventicio y solamente en muy pocos casos fueron basales, por esta circunstancia se repitió esta prueba de nuevo y los resultados fueron los mismos, por lo que se decidió utilizar solamente auxinas.

En la prueba de auxinas se obtuvieron resultados satisfactorios y se confirmó el hecho de que éstas son hormonas que intervienen en el enraizamiento de las plantas (Plummer y Leopold, 1957) y son un factor esencial en la elongación radical (Scott, 1972 y Hill, 1977), obteniendo en los cultivos raíces de hasta 8.5 cm de longitud.

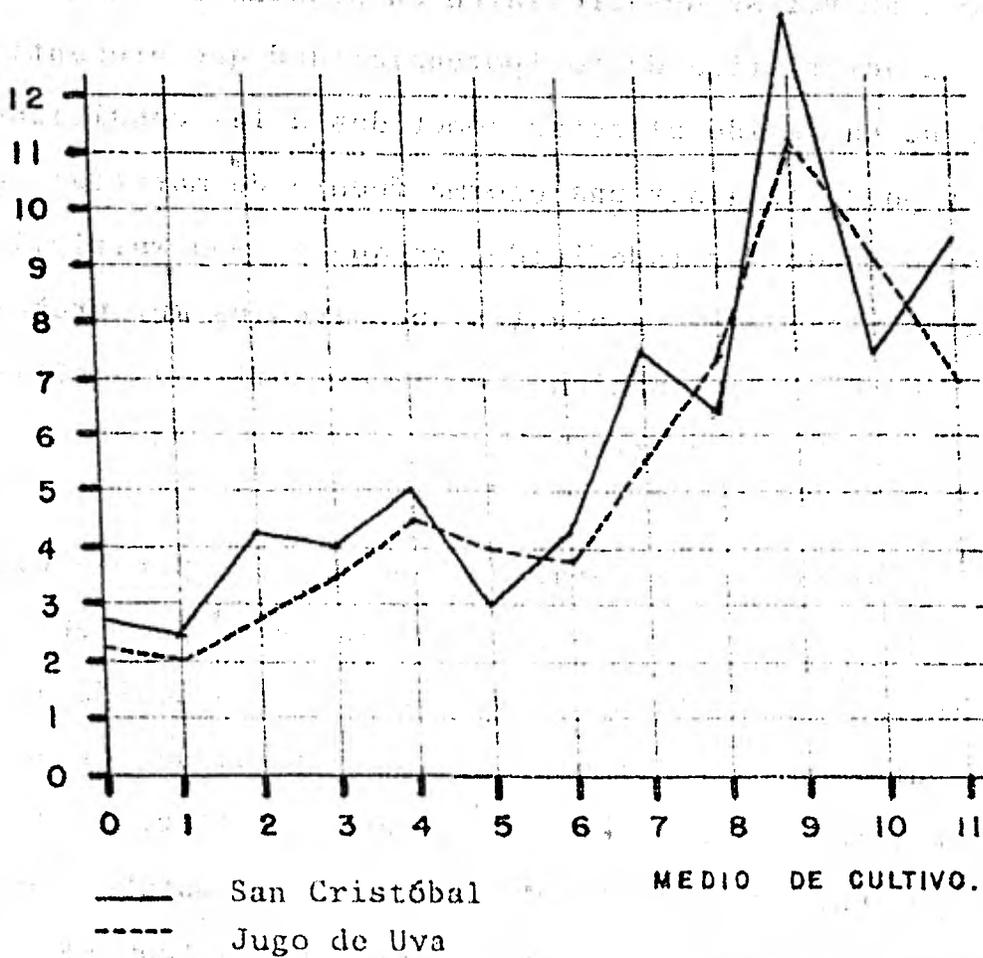
Ahora bien, en lo concerniente al número de raíces que se formaron por plántula en los diversos medios de cultivo,

se puede apreciar en la Tabla 8 que se hicieron notables las diferencias entre ellos, por lo que se efectuó un análisis de varianza (Tabla 9) y se aplicó la prueba DMS (Tabla 10) y determinaron diferencias altamente significativas en los medios. Se observó que el número 9 fue el que indujo a la aparición de una gran cantidad de raíces, dicho medio contenía una menor proporción hormonal pero similar a la del Rótone-F, que es un compuesto a base de ANA e IBA que se utiliza comercialmente para el enraizamiento de esquejes y estacas.

Posteriormente, en orden decreciente de efectividad, se encontró que los medios 10, 11, 8 y 7 no presentaron diferencias significativas entre ellos; en las demás concentraciones, el número de raíces por plántula fue muy bajo lo que influyó notoriamente en el momento de llevarlas al sustrato en condiciones ambientales debido a que tendieron a la marchitez. En la Gráfica 2 se pueden apreciar claramente las diferencias que se presentaron en los medios empleados.

Por otra parte, en el tejido subyacente al epidérmico y subepidérmico se presentó una oxidación paulatina, pero en el caso de los medios inductores de brotes adicionados con 10 mg/lit de tiamina, los tejidos comenzaron a engrosarse formando conglomerados celulares de color verde claro, fenómeno que también se presentó en los trabajos desarrollados por Ikeda, et al. (1976) en soya y, además, se ha encontrado que tiene acción como regulador del crecimiento, al igual que la

Nº. DE RAICES /
PLANTULA



GRAFICA · 2

Efecto de diferentes medios de cultivo sobre el número de raíces producidas por plántula obtenida "in vitro" en dos cultivares de S. ionantha.

niacina (Levitt, 1974). Cuando esta masa de células fue "podada", es decir: fueron separadas las plántulas para enraizamiento, ésta pudo ser fragmentada y resembrada en el mismo medio en donde de nuevo se presentó organogénesis y después de un periodo similar al inicial, generó puntos de crecimiento, los que a su vez se desarrollaron en plántulas. Esto da idea de la característica de totipotencialidad que presentan las células de un tejido al estar sometidas a las condiciones "in vitro" y puede originar una enorme fuente de material vegetal, pero no puede ser indefinido, ya que en una multiplicación a largo plazo con trasplantes sucesivos es muy probable que se presenten declinaciones en la estabilidad genética del material (Thomas y Street, 1972).

Es conveniente hacer notar que los tejidos permanecieron en los medios de cultivo de 30 a 40 días y después de ese tiempo fueron pasados a un nuevo medio fresco debido a que algunos nutrimentos y hormonas se van degradando por acción de la luz, temperatura, etc. (Hartmann y Kester, 1979); pérdida de agua por evaporación y acumulación de metabolitos o desechos celulares como el ácido fenilacético o fenoles (Fridborg, et al., 1978) que pueden causar inhibición y hasta efectos de toxicidad en los tejidos (Yeoman y MacLeod, 1973 y Nitsch, 1979). Con este trasplante se evitaron estos problemas y además se notó que en porciones parcialmente oxidadas este cambio las estimuló a iniciar la brotación debido probablemente a que ya hubo disponibilidad de nutrimentos y

acción hormonal, como se observa en la Figura 5.

Se notó que si en el momento de hacer un trasplante como el que se menciona en el párrafo anterior, llegaba a desprenderse una hoja o si la plántula se encontraba inclinada, en contacto con el medio, ésta inició el proceso de indiferenciación dando lugar a un conglomerado celular que a su vez originó nuevas plántulas. Esto nos da idea de la enorme potencialidad de Saintpaulia ionantha, Wendl. para producir grandes cantidades de plantas.

Adaptación

Cuando las plántulas alcanzaron una altura de 2 a 3 cm (Fig. 6) y el sistema radicular se formó con una longitud de 1.5 cm aproximadamente (de 60 a 70 días), fue posible pasarlas al sustrato preparado y esterilizado. En la Tabla 13 se anotaron los resultados de la adaptación ambiental de plántulas obtenidas "in vitro" a las diferentes mezclas, en la Tabla 14 aparece su análisis de varianza el cual mostró una alta diferencia significativa entre tratamientos, por lo que se aplicó la prueba de contraste múltiple de medias (Tabla 15) en la que se puede apreciar que los mejores resultados se obtuvieron en las mezclas de turba con arena, la del laboratorio y arena de río (Gráfica 3), las que no mostraron diferencias significativas entre ellas pero en la primera y -

... en el momento en que se inicia el proceso de inducción...
 ... de la actividad enzimática...
 ... el momento en que se inicia el proceso de inducción...
 ... de la actividad enzimática...
 ... el momento en que se inicia el proceso de inducción...
 ... de la actividad enzimática...



FIGURA 5

Porción de tejido oxidado con inicio de protección posterior al trasplante a medio nuevo de inducción.

... (2) ...
 ...
 ...
 ...

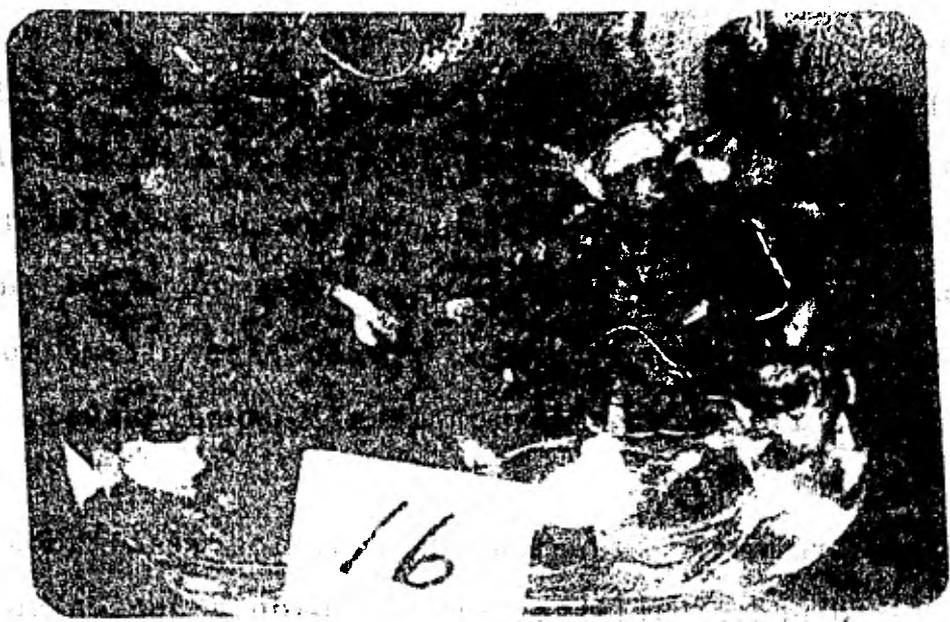


FIGURA · 6

Plántulas enraizadas listas para ser llevadas a los diferentes sustratos preparados para su adaptación a condiciones ambientales.

tercera se presentaron algunos inconvenientes.

En la turba y arena, las plantas se desarrollaron notablemente y se mantuvieron en buenas condiciones, pero existió cierta tendencia a la frecuente contaminación por hongos saprófitos, por lo que fue necesario dar tratamientos periódicos con soluciones de Benlate y después de 20 a 30 días de aplicación, empezaron a presentar problemas de tipo fitotóxico, aún cuando se trataron con diversas soluciones del fungicida que iban desde 100 a 1000 ppm, siendo esta última lo recomendado por la literatura (Agrichemicals Label Manual, 1975)

En lo concerniente a la arena de río, los resultados son hasta cierto punto satisfactorios. Debido a que en este sustrato se presentan normalmente carencias de algunos de los nutrimentos que requieren normalmente las plantas, después de tres semanas de haber depositado las plántulas, se presentó la tendencia a la clorosis, para evitarlo se agregó una solución al 0.5% de Ortho Fish Emulsion (5-1-1), que es utilizada por algunos propagadores de esta planta con buenos resultados a los 15 días de aplicación, pero debido a que es difícil conseguirlo se suspendió su uso. Sería conveniente hacer ensayos con diferentes soluciones nutritivas reportadas por diversos autores para trabajar hidroponia en arena, lo que daría la pauta a otro trabajo sobre nutrición mineral.

Para la mezcla de sustratos preparada en el laboratorio

(según Van Pelt, 1978), se determinó que las plantas tuvieron un buen desarrollo, las pérdidas durante esta transición fueron mínimas, es decir: en el paso de "in vitro" a condiciones ambientales, y además presenta la ventaja de no contaminarse tan fácilmente como ocurre en el caso de la turba. Debido a estas causas, las plantas siguieron siendo colocadas en esta mezcla y al término de seis meses se presentó la primera floración en ambos cultivares (Fig. 7).

Por lo que respecta a la mezcla comercial específica para violetas africanas, se hicieron cuatro siembras de 25 plantas cada una y como se puede apreciar en la Gráfica 3, solamente un 9% sobrevivió y las demás se marchitaron dentro de los siete días siguientes a la siembra. Es conveniente hacer notar que los almácigos que contenían esta mezcla permanecieron en las mismas condiciones que los demás almácigos con los otros sustratos, por lo que el material no cumplió con los objetivos para los cuales se vende.

Como se puede apreciar en los resultados presentados, es posible llevar a cabo una evaluación general y final del proyecto. En la primera parte (inducción de brotes foliares), se pudo observar que en el medio 1, hubo una producción de 30.43 brotes/cm² de tejido y si se toma en cuenta que en cada frasco con ese medio se sembraron cinco fragmentos con esas dimensiones, se obtuvo un total de 152.15 plántulas que pasaron a

... de las plantas producidas "in vitro" ya en estado de floración.



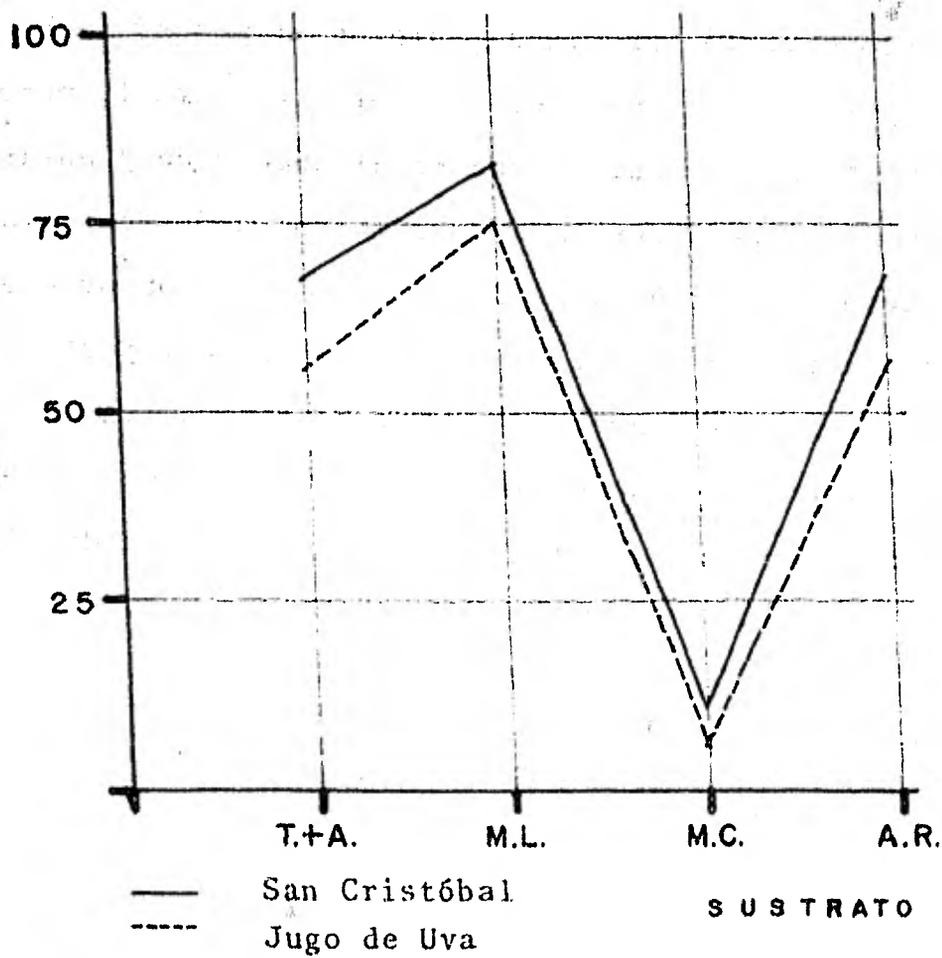
FIGURA - 7

Aspecto de las plantas producidas "in vitro" ya en estado de floración.

la segunda fase (enraizamiento) al medio 9 de auxinas, donde se convirtieron en plántulas de 2 a 3 cm con raíces y luego se transfirieron a la mezcla del laboratorio en donde florecieron plenamente.

Este ciclo ocurrió aproximadamente en 11 meses, hecho que fue a la par con la propagación vegetativa normal, pero hay un incremento muy grande en cuanto al número de plantas que se obtienen por hoja sembrada en cultivos asépticos, ya que el area promedio por hoja es de 11.5 cm^2 y se obtuvieron de 335 a 350 plantas en comparación con el máximo reportado de seis plantas por hoja enraizada en arena o agua (Van Pelt, 1978), y esta cantidad se puede incrementar notablemente debido a la totipotencialidad de cada célula vegetal para dar lugar a un organismo completo (Murashige, 1977).

% DE ADAPTACION



GRAFICA · 3

Porcentaje de adaptación ambiental de plántulas obtenidas "in vitro" de dos cultivares de *S. ionantha*.

		CULTIVAR	
		SAN CRISTOBAL	JUGO DE UVA
M E D I O D E C U L T I V O	0	5.77	7.23
	1	31.35	21.51
	2	15.73	12.24
	3	9.15	7.34
	4	7.87	7.56
	5	11.86	15.97
	6	23.82	17.73
	7	11.83	20.01
	8	15.99	14.83
	9	20.12	17.58

TABLA . I

Número de brotes/cm² de tejido foliar de dos cultivares (oro y verde) de *S. ionantha* desarrollados en diferentes medios de cultivo para inducción.

ANÁLISIS DE VARIANZA

GRUPO	TRATAMIENTO
1	00.645
18	1043.667
19	1044.312

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F.C.
TRATAMIENTO	1	00.645	00.645	0.0117
ERROR EXPERIMENTAL	18	1043.667	54.929	
TOTAL	19	1044.312	55.574	

TABLA · 2

Análisis de varianza para evaluar la respuesta de dos cultivares de *S. ionantha* para la producción "in vitro" de brotes foliares.

CULTIVAR

MEDIO DE CULTIVO

	0	1	2	3	4
SAN CRISTOBAL	5.77	31.35	15.73	9.15	7.87
JUGO DE UVA	7.23	29.51	12.24	7.34	7.56

5	6	7	8	9
11.86	23.82	11.83	15.99	20.12
15.97	17.63	20.01	14.83	17.54

TABLA · 3

Producción en los medios de cultivo utilizados para la inducción de brotes foliares (brotes/cm² de tejido) en dos cultivares de *S. ionantha*.

22

ANÁLISIS DE VARIANZA

F.	S.	S.	T.	S.	S.
10.0	21.3	27.21	22.15	25.12	16.20
10.0	21.3	27.21	22.15	25.12	16.20

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F.C.
TRATAMIENTO	9	919.137	102.126	15.501**
ERROR EXPERIMENTAL	10	125.175	6.588	
TOTAL	19	1044.312	108.714	

TABLA 4

Análisis de varianza para evaluar las diferencias en producción de los medios de cultivo empleados para la inducción de brotes foliares.

TRATAMIENTO	\bar{X} TRATAMIENTO
1	30.430
6	20.725
9	18.850
7	15.920
8	15.410
2	13.985
5	13.915
3	8.245
4	7.715
0	6.500

TABLA · 5

Prueba de la diferencia mínima significativa para Contraste
 de medias del número de brotes/cm² de tejido.

CULTIVAR

MEDIO DE CULTIVO	SAN CRISTOBAL	JUGO DE UVA
	0	2.77
1	2.62	2.13
2	4.18	2.72
3	3.93	3.57
4	5.01	4.74
5	2.96	4.03
6	4.24	3.81
7	7.69	5.63
8	6.64	7.43
9	13.13	11.26
10	7.57	9.19
11	9.46	6.94

TABLA · 6

Número de raíces obtenidas por plántula en dos cultivos de *S. ionantha*.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F.C.
TRATAMIENTO	1	4.231	4.231	0.458
ERROR EXPERIMENTAL	22	202.899	9.220	
TOTAL	23	207.130	13.451	

T A B L A · 7

Análisis de varianza para evaluar las diferencias en el número de raíces obtenidas por plántula en dos cultivares de S. ionantha.

		MEDIO DE CULTIVO					
CULTIVAR		0	1	2	3	4	5
	SAN CRISTOBAL	2.77	2.62	4.18	4.98	5.01	2.96
	JUGO DE UVA	2.23	2.13	2.72	3.57	4.74	4.03

	6	7	8	9	10	11
	4.24	7.69	6.64	13.35	7.57	6.46
	3.81	5.63	7.43	11.26	9.19	6.94

T A B L A . 8

Medias de la producción de raíces obtenidas en diferentes medios de cultivo en dos cultivares de *S. ionantha*.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F.C.
TRATAMIENTO	11	195.970	17.815	19.154**
ERROR EXPERIMENTAL	12	11.161	0.930	
TOTAL	23	207.131	18.745	

TABLA · 9

Análisis de varianza para evaluar la producción de raíces en los diferentes medios de cultivo en dos cultivares de S. - ionantha.

TRATAMIENTO	\bar{X} TRATAMIENTO
9	12.295
10	8.380
11	8.200
8	7.035
7	6.660
4	4.875
6	4.025
3	3.750
5	3.495
2	3.450
0	2.500
1	2.357

TABLA · 10

Prueba de la diferencia mínima significativa para contraste de medias del número de raíces por plántula en dos cultivos de *S. ionantha*.

C U L T I V A R

S U S T R A T O	S A N C R I S T O B A L			J U G O D E U V A		
	No. DE PLANTAS ADAPTADAS	%	ARCO SENO	No. DE PLANTAS ADAPTADAS	%	ARCO SENO
T. + A.	68	68	55.55	56	56	48.45
M. L.	83	83	65.55	74	74	59.34
M. C.	11	11	17.39	7	7	15.34
A. R.	68	68	55.55	58	58	49.60

T A B L A · I I

Porcentaje de adaptación ambiental de plántulas obtenidas "in vitro" de dos cultivares de S. ionantha.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F.C.
TRATAMIENTO	1	76.233	76.233	0.1956
ERROR EXPERIMENTAL	6	2338.313	389.7188	
TOTAL	7	2414.546	465.9518	

TABLA. 12

Análisis de varianza para evaluar la adaptación ambiental de dos cultivares de *S. ionantha*.

S U S T R A T O

CULTIVAR.

	T. + A.			M. L.		
	No. DE PLs. ADAPTADAS	%	ARCO SENO	No. DE PLs. ADAPTADAS	%	ARCO SENO
SAN CRISTOBAL	68	68	55.55	83	83	65.65
JUGO DE UVA	56	56	48.45	74	74	59.34

	M. C.			A. R.		
	No. DE PLs. ADAPTADAS	%	ARCO SENO	No. DE PLs. ADAPTADAS	%	ARCO SENO
	11	11	19.37	68	68	55.55
	7	7	15.34	56	56	49.60

TABLA - 13

Porcentaje de plantas adaptadas en los diferentes tipos de sustratos.

O T A R T O 2

F. V.	G. L.	S. C.	C. M.	F. C.
TRATAMIENTO	3	2046.266	682.0886	7.4083*
ERROR EXPERIMENTAL	4	368.280	92.0700	
TOTAL	7	2414.546	774.1586	

T A B L A · 14

Análisis de varianza para evaluar las diferencias entre el número de plantas adaptadas en los diferentes sustratos empleados.

TRATAMIENTO	\bar{X} TRATAMIENTO
M . L .	62.495
A . R .	57.575
T . + A .	57.000
M . C .	12.355

TABLA - 15

Prueba de la diferencia mínima significativa para contraste de medias en los porcentajes de adaptación a condiciones ambientales de dos cultivares de *S. ionantha*.

CAPITULO IV

CONCLUSIONES

Conclusiones

. Es recomendable utilizar material sano y en estado de madurez, es decir: evitar en lo posible tomar material proveniente de plantas enfermas o con hongos saprófitos en el sustrato que se encontraban, para así tener mayores probabilidades de establecer un cultivo aséptico y, por otra parte, el tejido debe ser maduro para impedir problemas de oxidación - por la esterilización si es muy joven o, si es muy viejo, con la presencia de pigmentos accesorios o de inhibidores como el ácido absícico que estarían presentes en hojas demasiado maduras.

. Se demostró que es posible la inducción a morfogénesis en tejidos foliares de *S. ionantha*, Wendl. en presencia de auxinas y citocininas; si el medio de cultivo carecía de ellas, la organogénesis sí se presentó, pero es muy lento el proceso y las plántulas obtenidas se desarrollaron pobremente.

. Se estableció que no existieron diferencias significativas en el comportamiento de los cultivares utilizados al ser sometidos al cultivo de tejidos en las dos primeras fases, ni en la tercera etapa de adaptación.

. Es conveniente hacer notar la importancia de la concen

tracción hormonal empleada; se pueden obtener diferentes órganos dependiendo de ésta: como son los brotes, raíces, embriones somáticos o conducir a la indiferenciación celular constituyendo callos.

. La vitamina B1 o tiamina en esta planta tiene, probablemente, acción como reguladora del crecimiento debido a que indujo a la proliferación celular. Dentro de este aspecto cabría señalar la posibilidad de llevar a cabo estudios más detallados al respecto.

. Como se pudo observar, las auxinas utilizadas se mostraron como estimuladoras del enraizamiento en esta especie (y como ocurre con muchas otras), y esto no se utiliza comúnmente en la práctica comercial, por lo que sería recomendable hacer pruebas "in vivo" para estimular el proceso.

. Como se mencionó anteriormente, el uso de la arena de río tuvo buenos resultados a excepción de la clorosis que se presentó en las plantas, para esto sería de gran utilidad emplear las soluciones nutritivas que se usan en los estudios de hidroponia y determinar la mejor para esta planta, pero esto sería tópico para otros temas de estudio.

. El proceso de inducción a la formación de brotes se produjo aproximadamente en tres meses y el enraizamiento en dos; la etapa más lenta fue la del crecimiento fuera del me-

27

dio de cultivo (cuando se estableció el autotrofismo, la adaptación, etc.), que concluyó a los seis meses con la primera floración, lo cual indica que es un lapso similar al de la planta propagada por el método tradicional, pero la cantidad de plantas fue muy superior a la que se obtiene mediante el enraizamiento de hojas, lo que puede dar la pauta a procesos de propagación más refinados (en este caso el cultivo de tejidos) pero a la larga costeables como ha ocurrido con Pseudotsuga sp. (Fossard, 1977) y con otras especies vegetales.

Observaciones finales

El cultivo de tejidos y células vegetales ha constituido un notable progreso en los últimos años, ya que puede ser aplicado en una gran diversidad de plantas y se puede decir que ha revolucionado varios aspectos agrícolas y hortícolas.

La producción de miles de plantas por esta vía puede llevarse a cabo rápidamente (Bini, 1977 y Holdgate, 1977).

Durante la década pasada, la propagación "in vitro" de varias especies ha sido estudiada y realizada por una gran cantidad de investigadores y propagadores, estimulada en parte por el éxito comercial que ha tenido; sin embargo, se presentan todavía serias deficiencias debido a que las técnicas no están completamente comprendidas y controladas ya que, por ejemplo, se ha dado el caso de muchas orquídeas producidas por algunas compañías no son libres de virus, y esto deriva de la posibilidad de obtenerlas utilizando meristemas en cultivo "in vitro", fenómeno que no siempre ocurre, ocasionando desastres de tipo económico para el floricultor que obtuvo dicho material (Fossard, 1977).

Las técnicas actuales de micropropagación como labores intensivas y con control de calidad para certificar lotes li-

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- . Agrichemicals label manual. 1975. E. I. DuPont de Neumors & Co. (Inc.) Biochemicals Departament. Wilmington, Delaware.
- . Aitchinson, P., A. MacLeod & M. Yeoman. 1977. Growth paterns in tissue (callus) cultures, en "Plant tissue and cell culture". Ed. por H. E. Street. Univ. of California. Berkeley, U.S.A.
- . Arditti, J. & M. Strauss. 1979. Taro tissue culture manual Information document #4. Noumea, New Caledonia.
- . Azaola, A. 1979. Papel de los reguladores del crecimiento vegetal en el cultivo de tejidos "in vitro". Tesis profesional, Fac. Química, U.N.A.M. México.
- . Bilkey, P., S. McCrown & A. Hildebrandt. 1978. Micropropagation of african violets from petiole cross sections. Hort Sci. 13(1): 37-38.
- . Bini, G. 1977. La propagazione clonale "in vitro" (micropropagazione). L'Informatore Agrario 48:28637-28645.
- . Cathey, H., L. Campbell & R. Thimijan. 1978. Comparative development of 11 plants grown under various fluorescent lamps and different durations of irradiations with and without incandescent lighting. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 103(6): 781-791.

- . Cooke, R. 1977. Tissue culture propagation of african violets. HortSci. 12(6): 549.
- . Ehrlich, H. 1958. Cytological studies in Saintpaulia, Wendl. Amer. J. Bot. 45: 177-182.
- . Fossard, R. 1977. Tissue culture in horticulture- A perspective. Acta Horticulturae 78: 455-459.
- . Fridborg, G., M. Pedersen, L. Landstrom & T. Eriksson. 1978. The effect of activated charcoal on tissue cultures: adsorption of metabolites inhibiting morphogenesis. Physiol. Plant. 43: 104-106.
- . Gundersen, A. 1950. Families of dicotyledons. Chronica Botanica. Mass., U.S.A.
- . Hanchey, R. 1954. Effects of fluorescent and natural light on vegetative growth in Saintpaulia. Amer. Soc. Hort. Sci. 66: 374-382.
- . Hartmann, H. y D. Kester. 1980. Propagación de plantas. Cia. Ed. Continental, S. A. México.
- . Heintz, L. 1973. How to grow and bloom african violets. Green Thumb Publ. Ohio, U.S.A.
- . Hentrich, W. & B. Berger. 1974. Untersuchungen über die mutagen effizienz von N-nitrose N-methylharnstoff bei Saintpaulia ionantha, Wendl. Arch. Züchtungsforsch, Berlin 4(1) 29-43.
- . Herklotz, Von A. 1969. Über den einfluss konstanter und einmal täglich wechselner temperaturen auf wachstum und entwicklung von Saintpaulia ionantha, Wendl. Gartenbauwissenschaft, 29(4): 425-438.

- Hildrum, H. & T. Kristoffersen. 1969. The effect of temperature and light intensity on flowering in Saintpaulia ionantha, Wendl. Acta Horticulturae 14: 249-255.
- Hill, T. 1977. Hormonas reguladoras del crecimiento vegetal. Ed. Omega. Barcelona, España.
- Holdgate, P. 1977. Propagation of ornamentals by tissue culture, en "Plant, cell, tissue and organ culture". Ed. por J Reinhert & Y. Bajaj. Springer-Verlag. New York, U.S.A.
- Hughes, K., S. Bell & J. Caponetti. 1975. Anther-derived haploids of the african violet. Can. J. Bot. 53: 1442-1444.
- Hutchinson, T. 1959. The families of flowering plants. Vol I Oxford Univ. Press. London.
- Ikeda, M., K. Ohira & K. Ojima. 1976. The tiamine requeriment for callus formation for soybean hypocotyl. Plant & Cell Physiol. 17: 1097-1098.
- Johansson, D. 1978. Saintpaulias in their natural enviroment with notes on their present status in Tanzania and Kenya. Biol Conserv. 14(1): 45-62.
- Kramer, J. 1978. How to grow african violets. Lane Publ. Co. California, U.S.A.
- Kukulczanka, K. & G. Suszynska. 1972. Regenerative properties of Saintpaulia ionantha, Wendl. leaves cultured "in vitro". Acta Soc. Bot. Pol. 41: 503-509.
- Levitt, J. 1974. Introduction to plant physiology. The C. V. Mosby, Co. Saint Louis, U.S.A.
- Milletti, G. 1966. Note sulla "violetta africana". Frutticoltura 28: 491-500.

- . Murashige, T & F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- . _____ . 1974. Plant propagation through tissue cultures. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25: 135-166.
- . _____ . 1977. Plant, cell and organ cultures as horticultural practices. *Acta. Horticulturae.* 78: 455-459.
- . Naylor, E. & B. Johnson. 1937. A histological study of vegetative reproduction in Saintpaulia ionantha. *Am. J. Bot.* 24: 673-678.
- . Nitsch, C. 1979. Comunicación personal.
- . Plummer, T & A. Leopold. 1957. Chemical treatment for bud formation in Saintpaulia. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 70: 442-444.
- . Rao, A. & G. Morel. 1973. Effects of Agrobacterium sp. on petiole cultures of Saintpaulia. *Phytomorf.* 23(1 y 2): 1-8.
- . Reed, S. 1974. African violet genetics. *J. Heredity* 45: 225-230.
- . Reinhert, J., Y. Bajaj & B. Zbell. 1977. Aspects of organization-organogenesis, embryogenesis and cytodifferentiation, en "Plant, cell, tissue and organ culture". Ed. por J. Reinhert & Y. Bajaj. Springer-Verlag. New York, U.S.A.
- . Salisbury, B. & C. Ross. 1978. Plant physiology. Wadsworth Publ. Co. New York, U.S.A.
- . Scott, T. 1972. Auxins and roots. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 23: 235-258.

bres de enfermedades son costeables en el caso de algunas plantas como el abeto de Douglas (Fossard, 1977), crisantemo y - clavel (Holdgate, 1977), orquídeas (Murashige, 1974), etc. y este número se está incrementando notablemente en varios centros de investigación y propagación comercial como son: Twyford Laboratories, East Malling Research Station, en Inglaterra; Istituto Sperimentale per la Frutticoltura, en Italia; - Rosh Hanikra Propagation Nurseries, en Israel; Bailey's Nursery Inc., en Estados Unidos; etc.

Para concluir, la abundante producción de plantas obtenidas a partir del cultivo de tejidos "in vitro", sugiere que los procedimientos utilizados pueden ser la base de un método de multiplicación rápido y costeable, no solo para la violeta africana como en este caso, sino también para un gran cantidad de especies vegetales.

- . Scott, M. & M. Marston. 1967. Effects of mist and basal temperatures on the regeneration in Saintpaulia ionantha, Wendl. from leaf cuttings. Hort. Res. 7: 50-60.
- . Start, N. & B. Cumming. 1976. "In vitro" propagations of Saintpaulia ionantha, Wendl. HortSci. 11(3): 204-206.
- . Stilwell, F. 1949. Growing african violets under fluorescent light. Afr. Viol. Mag. 3: 34-35.
- . Street, H. 1977. Introduction, en "Plant tissue and cell culture". Ed. por H. E. Street. Univ. of California Press. Berkeley, U.S.A.
- . Thomas, E. & H. Street. 1972. Factors influencing morphogenesis in excised roots and suspension cultures of Atropa belladonna. Ann. Bot. 56: 123-145.
- . Thorpe, T. 1979. Organogenesis "in vitro": structural, physiological and biochemical aspects. Sin publicar.
- . Van Pelt, H. 1978. African violet book. Howtorn Books Inc. Publ. New York, U.S.A.
- . Vázquez, A., N. Davey & K. Short. 1977. Organogenesis in culture of Saintpaulia ionantha. Acta Horticulturae 78: 249-255.
- . Wareing, P. & D. Phillips. 1978. The control of growth and differentiation in plants. Pergamon Press. Oxford, London.
- . Warfield, D. 1973. Induction of mutations in african violet (Saintpaulia ionantha, Wendl.) by ethyl methane sulfonate. Hort. Sci. 8(1): 29.

- . Yeoman, M. & A. MacLeod. 1977. A tissue (callus) cultures techniques, en "Plant, tissue and cell cultures". Ed. por H. E. Street. Univ. of California Press. Berkeley, U.S.A.