

189  
UNIVERSIDAD-NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO.  
FACULTAD DE CIENCIAS.

OBTENCION *IN VITRO*, ADAPTACION A INVERNADERO Y  
COSTO DE PRODUCCION EN LABORATORIO DE *SAINPAULIA*  
*IONANTHA*, *Wendl CULT. 'NEPTUNE'*.

T E S I S

Que para obtener el título de

BIOLOGO

presenta

Ma. de Lourdes Venegas Palma.

1983



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## INDICE.

	<u>Página.</u>
Resumen	i
Introducción	1
La Violeta Africana <i>Saintpaulia ionantha Wendl</i>	3
Origen	3
Clasificación	3
Descripción Botánica	3
Importancia	4
Plagas y Enfermedades	5
Métodos de Propagación	6
Cultivo de Tejidos.	9
1.- Material Vegetativo	10
a) Selección de una planta madre	10
b) Elección del explante	11
c) Esterilización del material vegetal	11
2.- Medio nutritivo	12
3.- Reguladores de Crecimiento	13
4.- Otros Factores.	15
5.- Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Saintpaulia ionantha Wendl.</i>	16
Materiales y Métodos	19
Siembra <i>in vitro</i>	19

	<u>Página.-</u>
Inducción radical	20
Trasplante <i>in vivo</i> y adaptación a invernadero.	21
Costos	22
Resultados y Discusión.	24
Inducción a Brotes	24
Análisis Estadístico (brotes)	25
Inducción a raíces	28
Análisis Estadístico (raíces)	31
Adaptación a invernadero	32
Costos	44
Directos	46
Indirectos	49
Conclusiones	54
Bibliografía	56

## RESUMEN.

## RESUMEN.-

Este trabajo tiene como objetivos: Optimizar la metodología reportada por CONAFRUT (10) en *Saintpaulia ionantha*, Wendl, cultivar 'Nep<sup>u</sup>tune', adaptar a invernadero y determinar el costo unitario de producción en laboratorio.

Para la inducción a brotes, se realizó una siembra de segmentos de hoja en el medio Murashige y Skoog (24) con base en un diseño factorial 6 x 5 (ANA y BAP respectivamente) en un modelo completamente al azar, con 5 repeticiones, bajo condiciones controladas de luz y temperatura.

En todos los tratamientos se produjeron brotes que al desarrollar se formaron raíces en su base, completando la plántula.

Se hizo una comparación de enraizamiento con dos medios escogidos al azar, de los que indujeron formación de brotes y el medio óptimo reportado por CONAFRUT (10), no habiendo diferencia entre los tres tratamientos.

Finalmente se determinó el costo unitario de producción en laboratorio, concluyendo que el costo de propagación, *in vitro*, en base a una producción limitada resultó igual al precio encontrado en el mercado.

## INTRODUCCION.

## INTRODUCCION.-

El desconocimiento de algunas tecnologías para la producción y el poco apoyo financiero a los horticultores, ha hecho que la generación de flores y plantas de ornato en nuestro país constituya un proceso al que no se le ha prestado gran atención, aún así el medio ambiente favorable con que se cuenta, la potencialidad de regeneración que presentan algunas plantas de ornato y su relativo bajo costo de producción permitiría la obtención de cultivos, no solo para abastecer el mercado nacional; sino para alcanzar niveles de exportación. No obstante, no se cuenta con la calidad y cantidad necesarias para tal efecto. Además de no existir en el mercado normas específicas de calidad preestablecidas para la mayoría de las plantas ornamentales.

En las últimas décadas el cultivo *in vitro*, es una de las formas de producción de plantas, sin embargo en México, no ha sido empleado con fines comerciales.

Por este método se puede realizar una propagación masiva, además de las ventajas que presenta el cultivo aséptico. (9).

Otro punto a favor de este método, es que se pueden controlar -- la mayoría de los factores que afectan el proceso para obtener los productos deseados. Esto es, se proporcionan los factores necesarios para el desarrollo del cultivo. (7).

Entre los cultivos ornamentales que más aceptación comercial tienen, se encuentra la violeta africana *Saintapulia ionantha* Wendl. Esta planta presenta una alta capacidad de regeneración y su potencialidad se ilustra por la técnica de micropropagación. (3).

Las partes florales y hojas de violeta africana, presentan morfogénesis *in vitro*, la que se manifiesta bajo ciertas condiciones óptimas en la producción de brotes, los que a su vez, forman plántulas que posteriormente son transferidas a suelo (35) (10)



En 1981 CONAFRUT inició la primera fase sobre el cultivo *in vitro* de violeta africana *Saintpaulia ionantha Wendl* en los cultivares "Jugo de uva" y "San Cristóbal", y consistió en emplear diferentes concentraciones de ANA y BAP (Cuadro . 1), Para la obtención de brotes foliares en el enraizamiento, los reguladores de crecimiento fueron ANA e IBA (Cuadro . 2).

Además de establecer la técnica, otro aspecto importante a considerar, es que en este tipo de trabajos, pocas veces se estiman los costos que implican efectuar el cultivo *in vitro*; por lo que esta tesis tiene como objetivos:

- 1) Optimizar la metodología reportada por Hernández 1981 (10). - ampliando los niveles de reguladores de crecimiento, auxinas, y citocininas en *Saintpaulia ionantha, Wendl*; cultivar "Nep--tune".
- 2) Adaptar a invernadero los plántulas obtenidas *in vitro*.
- 3) Evaluar los parámetros de: tiempo de desarrollo, cantidad y calidad de plantas.
- 4) Determinar el costo unitario de producción.

LA VIOLETA AFRICANA *Saintpaulia ionantha* Wendl.

LA VIOLETA AFRICANA.- *Saintpaulia ionantha* Wendl.

Origen.-

La violeta africana fué descubierta en 1892, en Tanga al este de Africa, por el barón Walter Von Saint Paul, gobernador de Africa alemana del este. Las violetas africanas originales, son nativas de Tanzania, con algunas variedades encontradas en las montañas de Usambara y también en Kenia. (17).

Herman Wendland, un prominente botánico alemán, nombró el género *Saintpaulia* en honor a su descubridor (18).

Clasificación Botánica.-

Reino:	Vegetal
División:	Embryophyta
Subdivisión:	Angiospermae
Clase:	Dicotyledonae
Subclase:	Sympetala
Orden:	Tubiflora
Familia:	Gesneriaceae
Género:	<i>Saintpaulia</i>
Especie:	<i>Saintpaulia ionantha</i> , Wendl

(Gundersen 1950; Hutchinson, 1959; Milletti, 1966 Citado por Hernández 1981). (10).

Descripción Botánica del Cultivar "Neptune" (Fig. 1).

La descripción botánica es importante, ya que da una imagen de las características, atribuciones y naturaleza de los ejemplares en cuestión, así se provee información básica de toda la taxonomía, caracterización, identificación y clasificación; las cuales forman el núcleo para la determinación de la relación entre el taxa; aunque no siempre la descripción es absolutamente comprensiva, tiene que ser escrita, pa-

ra efectos de comparación; en este caso entre individuos de su misma especie, ya que continuamente se obtienen nuevos cultivares. La descripción del cultivar "Neptune", se llevó a cabo, en el herbario de la Facultad de Ciencias, U.N.A.M.

La violeta africana *Saintpaulia ionantha*, Wendl; cultivar "Neptune" es una hierba con hojas basales, lámina orbicular de 2.5-6 cm por 5.5 cm ápice redondo, base cordada, margen crenado, pubescencia hispida (pelos de 2-3 mm), envés glaucescente, haz verde oscuro (pantone 574)-(27). Venación pinada con 6-10 venas secundarias según la edad. Pedicelo hispido de 1.5-6cm de longitud, con un grosor de 3-5mm.

Inflorescencia monocésial, pedúnculo de 2.5 cm de largo, con un grosor de 1-2.7 mm, pedicelo de 1.6 a 3.2 cm de largo; grosor de 0.9 - 1.5 mm (ocasionalmente surge una flor solitaria en alguno de los pedicelos).

Brácteas lanceoladas de 5-9 mm de largo. Flor hermafrodita y cigomórfica. Caliz dialisépalo con cinco pétalos de 5-6.5 mm, hispidos. Corola color violeta (Pantone 272 U) (27). Gamopétala, con un diámetro de 3.5-4.5 cm de cinco lóbulos redondos de 1-2.1 cm por 1-1.6 cm. Estambres, 4-5, generalmente epipétalos, didínamos de 3-5mm de largo, estilo de color amarillo (Pantone 272 U) igual al de los pétalos. (16).

#### Importancia.-

Las violetas africanas, son cultivadas con éxito comercial en muchas partes del mundo. En Estados Unidos son consideradas como uno de los pasatiempos más populares desde su introducción en 1894.

En México, está adquiriendo cierta importancia como planta de ornato en interiores, por su capacidad de florecer a lo largo de todo el año. (17).

Sus flores presentan una amplia gama de colores debido a un pigmento antocianico denominado violanina, cuyos matices van desde un rosa pálido a través del rojo, a un púrpura brillante. (35).

También las hay bicolors, sus flores pueden ser pequeñas o grandes, sencillas o dobles, con pétalos lisos o corrugados.

Su follaje dispuesto en forma de roseta, siempre verde, es igualmente atractivo; además tanto las flores como las hojas, presentan un aspecto aterciopelado.

En México el colorido de las violetas africanas, no es muy extenso, las más comunes son las moradas, lilas, rosas, azules y blancas, -- sin embargo en E.U.A., se pueden encontrar más de 800 cultivares de esta planta obteniéndose continuamente nuevas tonalidades y formas, las que a su vez, han incrementado el interés entre los cultivadores. (19).

Esta gran variedad, ha hecho que en nuestro país se importen --- plantas completas o bien esquejes para su propagación.

#### Plagas y Enfermedades.-

La mayoría de las enfermedades que atacan a la violeta africana son causadas por hongos.

El hongo *Botrytis cinerea* causa manchas y hojas decaídas, cuando las plantas crecen en invernadero bajo condiciones de exceso de humedad. (28).

La pudrición de la corona causada por el hongo *Pythium ultimum*, Esta enfermedad se presenta en el invernadero, cuando las plantas son sobrerregadas y el drenaje no es satisfactorio. La corona y raíces de las plantas, se vuelven blandas, fungosas y las hojas se marchitan.

El *Oidium sp* frecuentemente ataca a las violetas en invernaderos comerciales, estos hongos son propagados por el aire.

La pudrición de los pecioloos puede ocurrir en el punto donde toca el borde de la maceta. Esto puede ser causado por sales fertilizantes las cuales son absorbidas por los poros de las macetas.

Los botones o yemas florales de las violetas africanas algunas veces se arrugan, volviéndose cafés y se desprenden prematuramente. Esto se debe a diferentes factores incluyendo bajas temperaturas, baja humedad y las extremas fluctuaciones en la mezcla de suelo, temperatura e intensidad de luz.

La clorosis aparece sobre las hojas y se dice que es debido a prácticas culturales desfavorables, tales como cambios bruscos de temperatura, también se presenta al humedecer con agua fría bajo la luz del sol.

Entre los insectos que atacan a la violeta africana, se encuentra el *Planococcus citri* conocido como chinche harinosa; ácaros y colembolos. Los nemátodos también la infestan (28).

Con respecto a los virus, se reportó que un rabdovirus que produce necrosis en las hojas el vector no se conoce, la transmisión de la savia resultó negativa, el sitio de maduración tampoco se conoce; la primera observación morfológica fué hecha por Ciampor y Dokoupil en 1974. (21).

#### Métodos de Propagación.-

La propagación es la multiplicación por vía de reproducción sexual y asexual.

##### a) Propagación sexual.-

En el ciclo sexual, se utiliza la propagación por semilla, mediante la cual se logran nuevas plantas individuales con características que reflejan la contribución genética de ambos -

progenitores.

En la reproducción por semilla, puede esperarse que se presente cierta variación entre las plantas hijas. (9).

El cultivo de la violeta africana por semilla, presenta el inconveniente de que se obtienen muy pocas plantas.

Por este método, a partir de una semilla se produce una planta floreciendo alrededor de los 10 meses, y se tienen a cambio nuevos fenotipos.

En este caso, las semillas deberán ser colocadas en un sustrato inerte cernido, a temperaturas de 25°C, con alta humedad relativa. Cuando el retoño es grande, puede ser trasplantado a macetas de plástico de 10 cm, llenándose con un suelo bien drenado y alto en contenido de materia orgánica. El suelo usado deberá esterilizarse previamente. Los retoños presentan un buen crecimiento bajo intensidades luminosas de 10.7 a 11.8 klxs. (19).

#### ) Propagación asexual.-

La propagación asexual es posible porque cada una de las células de la planta contiene toda la información necesaria para que el organismo se regenere, crezca y se multiplique en un medio ambiente adecuado. (34)

La meta de la propagación asexual, es producir plantas uniformes de un tipo seleccionado. La propagación vegetativa usualmente asegura las características deseadas de plantas seleccionadas, éstas se conservan en todos los clones. (23).

El método principal de propagación comercial de violeta africana es por esqueje de hoja, por este método se obtienen hasta

cuatro hijuelos. Se seleccionan las hojas maduras que están firmes y presentan buena apariencia. El largo del peciolo - debe ser de 2-3cm, haciéndose un corte sesgado.

Estos esquejes se colocan a enraizar en camas que contengan - un medio pasteurizado, que puede ser: arena, musgo, vermiculita o agrolita.

Las hojas son introducidas en las camas, de tal forma que no se toquen entre sí. Se recomienda colocarlas en un lugar -- sombreado en invernadero a 21°C. En aproximadamente 8 a 12- semanas, las plantas están listas para ser trasplantadas. Es tas se separan de la hoja, cuando tienen alrededor de dos cm- de alto, se colocan en macetas de seis cm y más tarde se cambian a macetas de 10 cm. (18,19).

Otro de los métodos de propagación asexual es el cultivo de - tejidos.



## EL CULTIVO DE TEJIDOS.

## EL CULTIVO DE TEJIDOS.-

El cultivo de células y órganos, provee excelentes sistemas para explorar la iniciación de órganos, la diferenciación celular y otros procesos morfogénéticos (23), también es posible su aplicación en productos farmacéuticos, mejoramiento de cultivos, etc.

La propagación por cultivo de tejidos es particularmente útil -- cuando se emplea asociado con el desarrollo de programas encaminados a la propagación masiva de plantas. En cultivos que son propagados fácilmente a través de esquejes, divisiones y otras técnicas convencionales asexuales, el método de cultivo de tejidos puede ser utilizado para mejorar substancialmente la multiplicación. (23).

Uno de los aspectos más significantes, es la utilidad que presenta en el área de la agricultura principalmente en:

- a) La rápida propagación de clones a lo largo de todo el año. (12).
- b) Material vegetal libre de microorganismos en un medio ambiente aséptico (7).
- c) Asistencia a los productores, para la provisión de planta madre.
- d) Posibilidad de obtener nuevos cultivares.

Muchos cultivos vegetales comerciales, contienen bacterias y hongos sistémicos y en algunos casos hasta virus, los cuales afectan la producción y frecuentemente la calidad y apariencia del producto; por lo que es económicamente deseable producir por este método plantas libres de tales microorganismos. (12).

Existen dos vías principales a seguir en el cultivo *in vitro* con fines de multiplicación y regeneración de plantas, producida por la alta potencialidad de las células.

Una es indirecta y requiere de la generación de callo formado -- por células indiferenciadas; y la otra es directa, manteniendo los elementos organizados del explante madre.

El establecimiento de la vía indirecta de multiplicación permite obtener grandes números de propágulos; sin embargo se presentan algunos inconvenientes:

- Los callos tienen una gran actividad mitótica, y es posible -- que después de cultivos sucesivos, se desarrollen mutantes, -- por lo que la progenie debe examinarse rigurosamente para asegurar la uniformidad.
- La producción de raíces y brotes, en este caso, no necesariamente resulta en plantas viables, por lo que las conexiones -- vasculares no siempre se forman.
- En algunas especies no hay diferenciación en callo.

En la ruta directa, el riesgo de que las células mutantes se lleguen a desarrollar es bastante bajo, y también se puede obtener un gran número de plantas, aunque con índice de multiplicación menor, que en la otra vía (20).

En cualquier programa para el mantenimiento de clones de propagación libres de enfermedades y fieles al tipo, implica seguir los siguientes pasos. (9):

#### 1.- Material Vegetativo.

##### a) Selección de una planta madre.-

Para la obtención de una planta madre, se debe considerar el número de plantas necesarias para los explantes; éstas deben estar libres de enfermedades (13) y presentar un -- buen desarrollo vegetativo, deben ser uniformes (9), en --

la fisiología y de la misma edad ontogénica (23).

b) Elección del explante.

La elección del explante es importante porque de éste depende gran parte del éxito del cultivo (13).

Es indispensable conocer la estación en la cual el explante es obtenido, así como el tamaño y la diferencia en calidad en la planta (23).

Los explantes de violeta africana deben ser de hojas procedentes del verticilo medio (hojas maduras), ya que con ellas se obtienen mejores resultados, debido a que pueden resistir el 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 el metabolismo (10).

c) Esterilización del material vegetal.

Todas las plantas que se encuentran en el medio ambiente, se consideran como contaminadas; normalmente la microflora es restringida a la epidermis, que es la interfase entre la planta y el medio ambiente; por lo que las células internas de las plantas son libres de microorganismos cuando no presentan enfermedades vasculares; sin embargo el problema técnico se reduce a la desinfección de la superficie de la porción vegetal que será explantada.

d) Transferencia del explante en el medio establecido.

e) Proliferación de brotes sobre el medio de multiplicación.

f) Transferencia de brotes a un medio enraizador.

g) Adaptación al medio ambiente.

## 2.- El Medio Nutritivo.-

Los nutrientes necesarios en un medio de cultivo varían con el tipo de planta y los objetivos de producción. De manera empírica se han desarrollado medios y técnicas específicas -- para ciertas plantas, que es posible que no sean aplicables a otras. (9).

Independientemente de la composición o concentración de los constituyentes de un medio, debe contener macro y micronutrientes. Los requerimientos de carbohidratos han sido satisfechos generalmente por la incorporación de sacarosa, ya que -- otros carbohidratos no han mostrado ser superiores a la sacarosa. (23).

El nitrógeno es frecuentemente provisto como nitrato a través de iones amonio. El fierro debe ser quelatado como sodio férrico, que en este estado es gradualmente liberado en el interior del medio de cultivo, de esta manera es utilizado por -- las células vivientes.

Las vitaminas, inositol, ácido nicotínico, piridoxina y tiamina se incluyen para suplementar los factores orgánicos. (34).

Carbohidratos.- Thorpe (33) reportó que en estudios -- sobre metabolismo de carbohidratos durante la formación de brotes se incrementa el proceso de la respiración. Para la siembra de hoja reportó que el medio semisólido es preferible.

Es necesario entonces, tomar en cuenta la importancia de cada uno de los constituyentes, ya que las células de una planta -- presentan un gran potencial de autosuficiencia y esto se ve -- reflejado en la relativa facilidad de su propagación además,-

tienen la habilidad de tomar simples sustancias para transformarlas en compuestos más complejos, por lo que todos son esenciales (7).

Para el cultivo de la violeta africana se ha empleado principalmente el medio Murashige y Skoog, en la producción de brotes foliares, suplementado con reguladores de crecimiento. -- Dicho medio contiene compuestos inorgánicos entre los que se encuentran los macro y micronutrientes, compuestos orgánicos, vitaminas, sacarosa y agar (30,6, 35, 2, 10). Para el desarrollo de raíces ha sido empleado el de Cooke (5). Hernández-- (10).

Otros medios empleados para la inducción de raíces, son el medio modificado de Morel y Müller. (30). En algunos casos no se utilizan reguladores de crecimiento y algunas veces como Bilkey y Cooking (2), utilizan suelo comercial para violeta africana.

El medio empleado para la siembra de fragmentos de hoja del cultivar "Neptune" fué el MS, 1962, Suplementado con reguladores de crecimiento. (Cuadro . 3).

### 3.- Reguladores de Crecimiento.-

Con respecto al medio de cultivo, es esencial eliminar todos los organismos por medio de la esterilización del mismo (7).- ya que también se desarrollan bacterias, hongos que pueden -- proliferar en él y sobre las células inoculadas inhibiendo el crecimiento por desprendimiento de productos tóxicos metabólicos. (34).

El medio nutritivo es frecuentemente enriquecido con sustancias que mejoran la organogénesis, especialmente la formación de brotes. (23).

**Auxinas.**- Según Thiman, es una sustancia orgánica que promueve el crecimiento (aumento de volumen) a lo largo del eje longitudinal (29).

Las auxinas son requeridas para la elongación, así como para la proliferación celular, aunque tiene otros muchos efectos adicionales. Las auxinas pueden tener un notable efecto sobre la diferenciación celular (26); y en el enraizamiento.

**Citocininas.**- Las citocininas forman el grupo más recientemente descubierto de hormonas naturales y por tanto, el menos conocido en su acción y efectos. Son hormonas cuya acción típica es activar la división celular y retardar la senescencia de los órganos.

Los efectos de la citocinina, en la fisiología del vegetal -- son varios, pero dos de ellos son típicos y fundamentales.

Producir una mayor actividad en el ritmo de la mitosis celular, por esto se le ha llamado hormona de la división celular, así como la auxina tiene cierto efecto en la división. -- también la citocinina promueve un poco el alargamiento. (29).

Adicionando esta hormona al medio nutritivo promueve el crecimiento celular y la diferenciación (26).

Skoog y Miller encontraron que la iniciación de brotes y raíces es básicamente regulada por interacciones entre auxinas y citocininas; en sus trabajos mostraron que ambas substancias son necesarias para el crecimiento de los tejidos. El patrón de organogénesis es determinado por su relativa alta concentración de auxinas, favorece la iniciación de raíces, mientras tanto se reprime la formación de brotes.

En contraste, concentraciones relativamente altas de citocininas inducen la iniciación de brotes y suprimen el enraizamiento. El control de inducción a raíces y brotes, por el balance de auxinas-citocininas, parece ser un fenómeno general entre las plantas. (23).

#### 4.- Otros Factores.-

Dentro de los factores importantes del medio ambiente son la luz y temperatura. La iluminación de cultivos vegetales puede ser, considerada en términos de intensidad, longitud, exposición y calidad. Los requerimientos de luz del cultivo de tejidos, no son los mismos que en las plantas completas (autotróficas). En el cultivo de tejidos la fotosíntesis no es actividad importante, excepto quizás durante la parte más tarde ya que ha sido provisto adecuadamente de carbohidratos, - sin embargo, la luz regula ciertos procesos morfogenéticos. - Se ha reportado que es importante para la formación de brotes y la iniciación de raíces.

Influencia de la temperatura.- En general, el cultivo de tejidos se mantiene, en un medio ambiente, en el cual, la temperatura es constante, cercana a 25°C y en los que se ha visto que los cultivos se desarrollan normalmente, sin embargo, se pueden modificar en el cultivo de plantas, principalmente - - anuales y tropicales.

En un programa de mejoramiento de clones libres de enfermedades y fieles al tipo, se recomienda seguir los tres pasos siguientes:

- a) Selección inicial de fuentes de material de propagación que sea fiel al tipo y este libre de agentes patógenos.
- b) Mantenimiento de este material en un bloque con protec-



ción adecuada contra reinfección.

- c) Un sistema de propagación y distribución mediante el cual ese material se disemine y no llegue a infectarse antes de llegar a los cultivadores. (19).

#### 5.- Cultivo *in vitro* de *Saintpaulia ionantha*, Wendl.

Kukulczanka y Suszynska indujeron la formación de brotes adventicios, por cultivo de órganos. (36).

Existen otros trabajos en los que se reporta la propagación por cultivo *in vitro* de *Saintpaulia ionantha*, Wendl, con gran éxito. (11), cultivaron anteras, obteniendo plantas haploides (30), reportaron la proliferación de pequeños brotes sobre secciones de hoja de violeta africana, al explantarlos sobre el medio Murashige y Skoog (MS), utilizando como reguladores de crecimiento Acido naftalen acético (ANA) y Sulfato de adenina; los pequeños brotes se subcultivaron en el medio modificado de Morel y Muller, sin reguladores de crecimiento, ahí crecieron y enraizaron en un período de 30 a 60 días, las condiciones del cultivo fueron, temperatura 23°C por 12 horas de luz a 3.2 KLX.

En otro trabajo, se obtuvieron alrededor de 70,000 plantas de violeta africana, de 20 diferentes cultivares, utilizando el medio MS, solo que en este caso, los reguladores de crecimiento fueron Acido Indol Acético (AIA) y Bencil amino purina - (6 BAP) para la inducción de brotes; y para enraizar el mismo medio adicionado  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ . Aquí el enraizamiento ocurrió de 30 a 60 días y no fué necesario el uso de reguladores de crecimiento. Las condiciones del cultivo fueron: Temperatura 27°C con 16 horas de luz a un KLX.

Vázquez, et al, 1977 (35) indujo la formación de callo del -

cultivo de partes florales (ovario, sépalo, pétalo) y hojas - de violeta africana, utilizando el medio MS suplementado con ANA y BAP. En este trabajo se utilizó para la inducción de raíces el medio MS aumentado con cinetina; los cultivos se -- mantuvieron a 25°C con 16 hs de luz.

Otra forma de obtención de brotes por cultivo *in vitro*, es colocando explantes de tejido epidérmico y subepidérmico del peciolo en el medio salino B<sub>5</sub>, añadiendo ANA y BAP. Para el - enraizamiento, se colocaron en suelo comercial. Una observación interesante de este trabajo fué que al trasplantarse al - suelo, las plantas regeneradas del tejido subepidérmico cre--cieron más vigorosas que aquellas derivadas de la epidermis - (2).

Hernández, (10) realizó una propagación masiva en los -- cultivos jugo de uva y San Cristóbal sobre el medio MS.

Para la producción de brotes, se utilizaron nueve diferentes - concentraciones de ANA y BAP (Cuadro ... 1). Para el enrai - zamiento, se realizaron tres diferentes pruebas con regulado - res de crecimiento. La primera, consistió en agregar al me - dio, ANA y cinetina; la segunda IBA y la tercera IBA y ANA. - (Cuadro ... 2).

En este trabajo se concluyó, que el medio óptimo fué el núme - ro uno en ambos cultivos, produciéndose hasta 30 brotes fo - liares por cm<sup>2</sup>, mientras que en los otros medios, hubo apari - ción de brotes, raíces y callo, pero éstas se formaron indis - tintamente en la superficie del tejido. Para la inducción - radicular, la mejor concentración fué de 0.5 mg por litro de - medio de IBA combinado con 0.30 mgr por litro de medio de ANA

CUADRO 1 Diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento adicionados al medio MS, - para la inducción de brotes foliares, en los cultivares "Jugo de Uva" y "San Cristóbal". (10).

		ANA mg/lm		
		0.10	0.20	0.50
BAP				
mg/1/2	0.01	1	2	3
	0.10	4	5	6
	0.50	7	8	9

---

CUADRO 2 Concentraciones de reguladores de crecimiento adicionadas al medio MS, para la inducción radicular. (10).

IBA		ANA mg/l medio
0.50	+	0.30
0.50	+	0.50
0.50	+	0.70

## MATERIALES Y METODOS. -

## MATERIALES Y METODOS.-

### Siembra *in vitro*.-

Para la realización de este trabajo, se adquirieron violetas africanas *Saintpaulia ionantha* Wendl, del cultivar 'Neptune' (Fig. 1).

Se seleccionaron hojas maduras y se esterilizaron de la siguiente manera:

- 1.- Se colocan en una solución de hipoclorito de calcio al 4% durante 15 minutos.
- 2.- Se enjuagan con agua destilada estéril.
- 3.- Alcohol etílico al 70% por cinco minutos.
- 4.- Y por último se aplican varios enjuagues con agua destilada estéril. (10).

Una vez desinfectadas las hojas, se secan con papel filtro. Es muy importante este paso, porque el exceso de agua provoca una rápida oxidación en el tejido.

Posteriormente se cortan (con material quirúrgico estéril) en porciones de aproximadamente un  $\text{cm}^2$  (figura 2). y se siembran en frascos que contienen 20 ml de medio MS (previamente esterilizado en el autoclave a 15 libras de presión por 15 minutos), posteriormente se colocan en el medio nutritivo, colocando la parte abaxial del explante hacia éste.

La siembra se realizó en 30 diferentes concentraciones hormonales de auxinas y citocininas (ANA y BAP respectivamente). En base a un diseño factorial 6 x 5 en un modelo completamente al azar con cinco repeticiones. (Cuadro 3).

**CUADRO 3** Diferentes niveles de auxinas y citocininas empleadas para la inducción de brotes foliares -- de *Saintpaulia ionantha* Wendl cultivar 'Neptune'

		ANA (mg/l medio)					
		0	0.10	0.15	0.20	0.25	0.30
BAP mg/l	0	I	VI	XI	XVI	XXI	XXVI
	0.005	II	VII	XII	XVII	XXII	XXVII
	0.01	III	VIII	XIII	XVIII	XXIII	XXVIII
	0.05	IV	IX	XIV	XIX	XXIV	XXIX
	0.1	V	X	XV	XX	XXV	XXX

Una vez sembrados los frascos se tapan y colocan en la cámara de incubación, bajo las siguientes condiciones:

Temperatura: 24-26°C.

Fotoperíodo: 16 horas de luz/8 de oscuridad.

Iluminación: 1500-1900 luxes.

La revisión de los frascos se hizo semanalmente, y el cambio de medio cada tres semanas. (Figura 3).

#### Inducción Radicular.-

Esta parte ya no era necesaria llevarla a cabo, ya que en todos los tratamientos para la inducción a brotes, se formaron plántulas --- (con raíz). (Figura 7). Sin embargo para efectos de comparación, a dichas plántulas se les eliminó la raíz y se colocaron en el medio -- VIII, XVI, tomadas al azar de las concentraciones hormonales que se -- usaron para la inducción a brotes (Cuadro 3) y en las que también se -- obtuvieron plántulas, además de esas dos concentraciones se empleó el -

medio enraizador óptimo reportado por Hernández (10) (Cuadro 2). Con las sales del medio Murashige y Skoog 1962. (24) (Cuadro 4).

Para esta comparación se realizó un modelo completamente al azar con 10 repeticiones, cada una con cuatro foliolos y se colocaron en las condiciones antes mencionadas.

Trasplante *in vivo* y adaptación a invernadero.

Una vez que en la base del follaje, se desarrollaron las raíces para formar plántula, adquirieron la característica de autotrofismo (8) por lo que ya no era necesario mantenerlas *in vitro*, independientemente del tamaño que presentaban.

La primera fase del trasplante, fué colocar las plántulas durante dos semanas en recipientes de plástico, que contenían agrolita, posteriormente se llevaron al invernadero, regándose cada 4 días con agua corriente.

Después de adaptadas se trasplantaron en palanganas que contienen una mezcla de tierra negra, hoja y agrolita (1:1:1) estéril y se sombrearon, dentro del invernadero; el riego se efectuó cada 8 días (Figs. 4 y 5).

Para la inducción radicular, se eliminaron de las plántulas, las raíces y se colocaron en el medio número VIII, XVI, tomadas al azar de las concentraciones hormonales que se usaron para la inducción a brotes y se compararon con el medio enraizador óptimo reportado por Hernández (Cuadro 5).

Para esta comparación se realizó un modelo completamente al azar con 10 repeticiones, cada una con cuatro partes foliares y se colocaron en las condiciones antes mencionadas.

Costos.-

Los costos se dividieron en directos e indirectos. El precio de reactivos y materiales se obtuvieron directamente de las casas comerciales en las que se encontraba el producto. Una vez estimados, se determinó el costo unitario en el laboratorio.

CUADRO 4 SALES MINERALES.-

Elementos Mayores		Elementos Menores.	
Sales	mg/l	Sales	mg/l
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	1650	$\text{H}_3\text{BO}_3$	6.2
$\text{KNO}_3$	1900	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	22.3
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440	$\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	8.6
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370	KI	0.83
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	170	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25
$\text{Na}_2\text{EDTA}$	37.31	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.8		

CONSTITUYENTES ORGANICOS.

Sacarosa	30 g/l	Acido nicotínico	0.5 mg/l
Glicina	2 mg/l	Piridoxina.HCL	0.5 mg/l
Myo-inositol	100 mg/l	Tiamina.HCl	0.1 mg/l
		Agar.	8 gr/l.



CUADRO 5 Medios enraizadores empleados en la comparación del desarrollo de raíces en brotes foliares de *Saintpaulia ionantha*, Wendl. cultivar 'Neptune'

ENRAIZADOR (E)	REGULADOR DE CRECIMIENTO. (mg/litro de medio)
1	0.1 ANA + 0.01 BAP
2	0.2 ANA + 0 BAP
3	0.3 ANA + 0.51 IBA

---

## RESULTADOS Y DISCUSION

## RESULTADOS Y DISCUSION.-

### Inducción a brotes.-

Después de cinco días de sembrados los explantes, se apreció crecimiento del tejido, adquiriendo una consistencia esponjosa, sin formación de callo en todos los tratamientos.

La iniciación de brotes en general, en los primeros cinco tratamientos ocurrió a 30-40 días, a excepción del nivel I, en el que transcurrieron de 48-60 días. En los siguientes 14 tratamientos de 18-30 días.

Estos resultados coinciden con los obtenidos por Cooke (5), sin embargo, después de los 60 días no se manifestó una producción múltiple.

La obtención de brotes en el testigo, se puede explicar por los niveles endógenos de hormonas que se encuentran en el tejido (15) (Figura No. 7).

En los siguientes 15 tratamientos, la inducción a brotes foliares, se inició a partir de los 10 días después de la siembra. Esto probablemente se debió a que estos recibieron las intensidades luminosas más altas, lo cual es muy importante, ya que regula ciertos procesos morfogénéticos. También se ha reportado su importancia para la formación de brotes, la iniciación de raíces y la embriogénesis asexual. (23).

La formación de brotes, se inició en la parte adaxial del explante, sobre la línea de corte y en algunos casos cubrió el resto del tejido. (Figura 7). Start y Cuming (30) obtuvieron resultados similares, apareciendo primero en las venas que tocaban el medio. En estudios histológicos de hoja de *Saintpaulia ionanthe*, Wendl; se observó que los brotes se originan en las células epidérmicas superiores e in-

feriores; sin embargo siempre son encontradas sobre o muy cerca de las venas. Las células epidérmicas son muy largas, poseen una enorme vacuola central, una delgada capa de citoplasma y un núcleo prominente.

Vázquez y Davey (35) sembraron discos de hoja y obtuvieron callo alrededor de los 35 días después del cultivo, éste se inició en el borde de la superficie herida antes de extenderse al tejido entero.

Estudios realizados al microscopio electrónico revelan, que los brotes son derivados de células epidérmicas, con lo que se confirman los estudios histológicos. Sin embargo, también se ha visto que son producidos, en el tejido subepidérmico mostrando, las plántulas que se forman a partir de éste, un mayor vigor. (2).

El número promedio de brotes obtenidos por cultivo *in vitro* de explantes de hoja, en un Diseño factorial 6 x 5 con cinco repeticiones en un modelo completamente al azar, se muestra en la Tabla (No. 1

Análisis Estadístico (brotes).-

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA), para comparar los efectos de los reguladores de crecimiento ANA, BAP y la interacción entre ambos; el modelo correspondiente fué:

$$Y_{mnj} = \mu + NA_m + BAP_n + (ANA \times BAP)_{mn} + E_{mnj}$$

Donde  $Y_{mnj}$  = a la medición de la j-enésima repetición del n-ésimo nivel de BAP, del m-enésimo nivel de ANA.

Donde:

$m = 1, 2, \dots, 6$  niveles de ANA

$n = 1, 2, \dots, 5$  niveles de BAP

$j = 1, 2, 3, 4, 5$  repeticiones.

Para dicho análisis se utilizó la distribución de F, donde el criterio de decisión fué:

Si el valor de F calculada (Fc) valor de F obtenida de tablas Rechaza la hipótesis nula (Ho).

Siendo  $H_{01}: ANA_1 = ANA_2 = \dots ANA_6$   
 $H_{02}: BAP_1 = BAP_2 = \dots BAP_5$   
 $H_{03}: \text{No hay interacción entre el ANA y el BAP.}$

CUADRO 6 Análisis de Varianza. (ANOVA)

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F. Calc.
ANA	5	100.8	201.75	7.4
BAP	4	318.1	79.53	2.9
ANA X BAP	20	603.5	30.18	1.1
ERROR	120	3,255.0	27.12	
TOTAL	49			

- F.V. Fuente de Variación.
- G.L. Grados de libertad
- S.C. Suma de cuadrados.
- C.M. Cuadrados medios.
- F. Calc. F. Calculada.

Comparando los valores de la F Calculada y la F obtenida en tablas, se tiene:

F. Calculada		F de tablas	Criterio de Decisión
ANA 7.4	>	2.29	Se rechaza $H_{01}$
BAP 2.9	>	2.45	Se rechaza $H_{02}$
ANA x BAP 1.1	∅	1.61	No se rechaza $H_{03}$

De acuerdo al ANOVA, se rechaza la hipótesis nula en el caso de ANA y BAP; por lo que se procedió a realizar comparaciones múltiples - mediante el método de Tuckey para ANA y BAP.

En lo que se refiere a la interacción entre ambos reguladores de crecimiento, no se rechaza la hipótesis nula, concluyendo que no hay - interacción entre ambos factores.

Para realizar la prueba de comparaciones múltiples, utilizando - el método de Tuckey:

1°.- Se calcula la diferencia mínima honesta (D.M.S.H.) la cual - se define de la siguiente manera:

$$D.M.S.H. = Q_{(g.1.1;g.1.2.)}^{1-\alpha} \sqrt{\frac{C.M. Error}{r}}$$

Donde:  $Q_{g.1.1;g.1.2.}^{1-\alpha}$  Es el valor que se obtiene de tablas.

g.1.1. = Número de medias que se están comparando.

g.1.2. = Grados de libertad del error.

r = Número de repeticiones.

2°.- Se calculan todas las posibles diferencias.

$$Y_i - Y_{i'} \quad i \neq i' \quad Y_i - Y_{i'} \quad DMSH$$

Se considera que  $H_0: \mu = \mu'$ ; se debe rechazar.

Reguladores de crecimiento	DMSH
ANA	4.2
BAP	3.5
ANA X BAP	9.5

En la comparación sobre tratamientos, se utilizaron las medias, colocándolas en orden creciente.

Concentración ANA	0.30	0.10	0.15	0.20	0.25	0
	21.8	21.4	21.2	21.2	19.5	14.4

Concentración BAP	0.01	0.05	0.005	0.0	0.10
	23.3	20.4	20.2	18.7	18.2

ANA: Para el caso de la auxina, se observó que el mayor número de brotes, se produjo en la concentración de 0.3 mg/l de medio. Sin embargo, la prueba de comparaciones múltiples, muestra que todas las concentraciones son iguales, excepto el testigo, en el que la diferencia fué altamente significativa; esto indica la importancia del suministro del ANA al medio nutritivo, para la inducción de brotes foliares.

BAP: En lo que respecta a la citocinina.- La concentración de 0.1 mg/l medio, presenta un mayor número de brotes con respecto a los demás, mostrando diferencias significativas en cuanto al testigo y a la de 0.1 mg/l medio. Mientras, que las concentraciones 0.05, 0.005, 0.0, 0.10 mg/l medio son iguales.

De acuerdo al ANOVA, al no haber interacción entre ambos reguladores de crecimiento, para la inducción de brotes en explantes de hoja, cualquiera que sea la concentración de ANA, dará resultados similares y en el BAP, se puede seleccionar la concentración en la que presente un mayor número de brotes, que en este caso es la de 0.01 mg/l medio de citocininas.

#### Inducción a Raíces.-

Existe una coordinación notable en los reguladores de crecimiento (26). Según la hipótesis de Skoog y Miller, la organogénesis frecuentemente depende del balance auxinas-citocininas, añadidas al medio.

En especies consideradas con una alta capacidad regenerativa, como lo es la violeta africana, se observa cierta especialización, ya que la expresión de diferentes capacidades organogénicas, brotes o formación de raíces parece estar relacionada con cierto patrón ordenado de organización de diversos tejidos, en el interior del órgano, y esto está relacionado a su vez con la posición de diversos órganos de la planta completa.

Cuando los brotes habían formado un conjunto de hojas a manera de roseta, se iniciaba el crecimiento de pequeñas raicillas gruesas y pubescentes, en la parte abaxial, en la línea de corte, abajo de los grupos de hojas, principalmente; formando entonces una plántula que posteriormente fué separada con una pequeña porción intermedia del tejido -- original entre las hojas y raíces, así se transforman al medio ambiente (Figura 8 y 9). Esto también ocurrió en el centro del explante, con algunos brotes.

En lo que respecta a los brotes restantes que se encontraban en el centro y en la que no hubo formación de raíces, sobre la parte abaxial del explante. éstas se desarrollaron hasta formar grupos de hojas; en su base y sobre la epidermis del explante se inició el desarrollo de raíces pubescentes, éstas se extendían sobre el tejido, completando así la formación de una nueva plántula, las que se tomaron con pinzas y fácilmente se desprendieron del tejido foliar sin dañarlo, quedando intacto y con una textura suave y brillante. (Figura 10). En todos los tratamientos hubo formación de plántulas, sin necesidad de cambiar los reguladores de crecimiento.

Naylor y Johnson, (1937) observaron que las raíces se desarrollan en la lámina foliar, se levantan endógenamente y aparecen siempre muy cerca de las venas; y el tejido del cual se originaron está estrechamente asociado con el sistema vascular. (25)

Vázquez y Davey (35) demostraron que las raíces se desarrollan de células derivadas de la epidermis de la hoja. Los centros meristemáti



cos que surgen de este tejido se desarrollan en primordios radiculares. Estas células meristemáticas presentaban citoplasmas compactos.

Según la hipótesis de Skoog y Miller, la organogénesis frecuentemente depende del balance auxinas-citocininas (23). Sin embargo en este caso, ambos reguladores de crecimiento indujeron - por separado la formación de plántulas, no habiendo interacción en ambos; verificando la necesidad de suplementarlas al medio nutritivo para obtener una mayor producción de brotes y raíces. Existen otras posibilidades que podrían explicar la inducción de brotes y raíces. Una de ellas es la acción del ácido traumático. Haberland demostró que - extractos de células dañadas son capaces de inducir la actividad meristemática cuando se encuentran con células no dañadas (6), por lo que - estas células meristemáticas pueden ser las responsables de la diferenciación a plántulas.

Existe también un fenómeno de formación propuesto por Torrey. - Este concepto establece que la formación de una estructura organizada - empieza por un grupo de células indiferenciadas, o un meristemoide. - Las células del meristemoide se asemejan a las de un meristemo apical, son típicamente pequeñas, se agrupan estrecha y relativamente isodiamétricas y de pared delgada. Contienen citoplasma denso y núcleo prominente. Hay una pequeña evidencia de vacuolación en estas células.

El meristemoide, es la estructura que responde al estímulo organogénético y depende de la dirección del estímulo, es capaz de organizarse en raíces, brotes o embrioides. (23).

Se ha mostrado que las citocininas estimulan la formación de un gran número de brotes laterales adventicios en Gerbera, según Murashige, Serpa y Jones, 1974. Sin embargo las citocininas no promovieron brotes laterales en este cultivo, lo que concuerda con los resultados obtenidos en los experimentos realizados por Vazquez y Davey (35).

Por otro lado se observó que del tratamiento XVI en adelante, las

plántulas presentaban muy buen desarrollo vegetativo y abundantes raíces después de algún tiempo; algunas eran delgadas y medían hasta cinco centímetros, mientras que otras eran pequeñas (1.5 cm) gruesas y -- pubescentes. En los tratamientos I, II, III, IV y V que carecieron -- de ANA, el desarrollo vegetativo no fué bueno y tardaron más tiempo en la aparición de brotes.

#### Análisis Estadístico (raíces).-

La formación de raíces, se presentaron en el medio enraizador 3 - ( $E_3$ ). En 20 días después de haberse eliminado las raíces formadas inicialmente. En los medios enraizadores uno y dos ( $E_1$  y  $E_2$ ) se produjeron de 8-15 días más tarde.

El número promedio de raíces desarrolladas por planta en cada tratamiento fué el siguiente:

CUADRO . . 7

Medio Enraizador	Raíces promedio.
$E_1$	20
$E_2$	20
$E_3$	22

La longitud de las raíces en general fué de uno a tres centímetros y algunas presentaban hasta 5.5 cm.

A el número de raíces obtenidas se aplicó un Análisis de Varianza. En un modelo completamente al azar, con tres tratamientos y 10 repeticiones.

ANOVA.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F Calc.
Tratamiento	2	3412.48	282.37	3.09
Error	27	3414.0	92.24	
Total	29	9690.52		

Se comparó el valor de la F calculada con la F de tablas, en base a la siguiente hipótesis.

Si el valor de F calc. > valor de tablas  $\Rightarrow$  Rechaza  $H_0$

$$F_{2,27}^{.05} = 3.3.$$

3.09  $\nless$  3.35  $\Rightarrow$  <sup>No</sup> Se rechaza  $H_0$

Por lo que los tres tratamientos son iguales.

De acuerdo a los resultados, no es necesario emplear diferentes reguladores de crecimiento para incrementar la inducción o desarrollo de raíces, ya que el mismo medio empleado para la formación y crecimiento de brotes foliares tuvo los mismos resultados que el medio enraizador reportado como óptimo. (10).

Adaptación a Invernadero.-

Las plántulas trasplantadas en el sustrato inerte, mostraron decaimiento en las hojas por 10 días, después se recuperaron poco a poco obteniéndose aproximadamente el 93% de plantas trasplantadas de *in vitro* a *in vivo*. El 7% se perdieron en su mayoría por oxidación de los tejidos más jóvenes.

Las plantas reestablecidas, se colocaron en una mezcla de sustrato antes mencionada, siendo en total 81.8% de plantas totalmente adaptadas, a partir de la cantidad inicial de 1,100 plántulas.

Finalmente estas plantas fueron trasladadas a viveros comerciales, ubicados en Cocoyoc, Morelos; para completar su desarrollo.

En actividades complementarias a este trabajo, violetas africanas obtenidas anteriormente *in vitro*, se establecieron en dichos viveros, mostrando una gran superioridad en cuanto a apariencia, desarrollo vegetativo y floración, en comparación con las producidas en el mismo lugar a partir de esqueje.

Tabla 1.

Tratamiento	Brotes promedio	Tratamiento	Brotes promedio
I	12	XVI	20
II	13	XVII	21
III	18	XVIII	25
IV	14	XIX	22
V	15	XX	18
VI	22	XXI	20
VII	19	XXII	23
VIII	28	XXIII	20
IX	23	XXIV	17
X	16	XXV	18
XI	18	XXVI	21
XII	22	XXVII	23
XIII	19	XXVIII	23
XIV	26	XXIX	21
XV	21	XXX	21

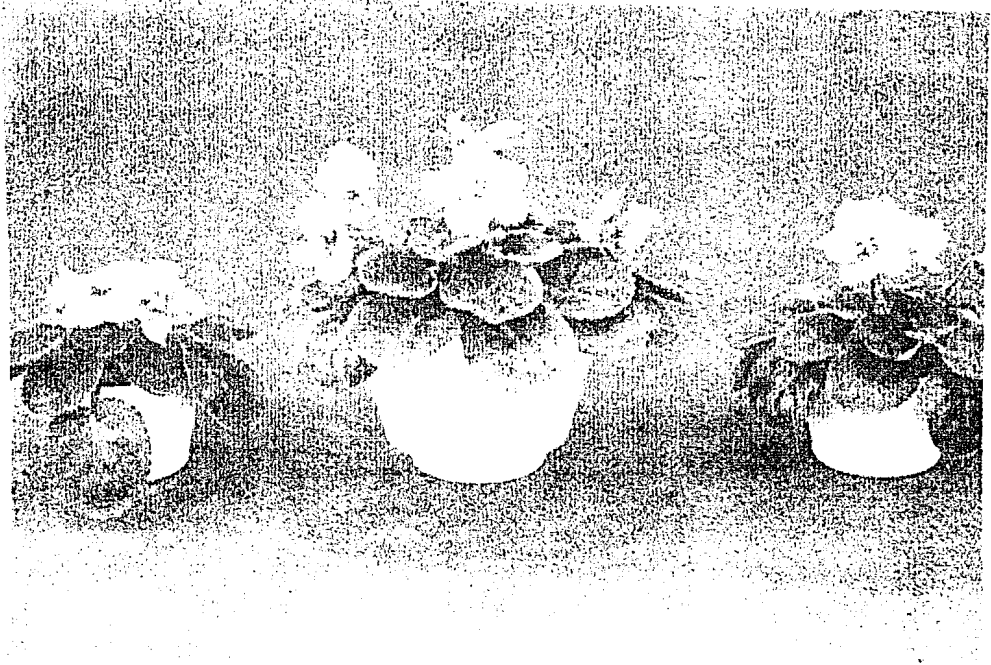


FIGURA . 1 Violetas Africanas del Cultivar "Neptune"

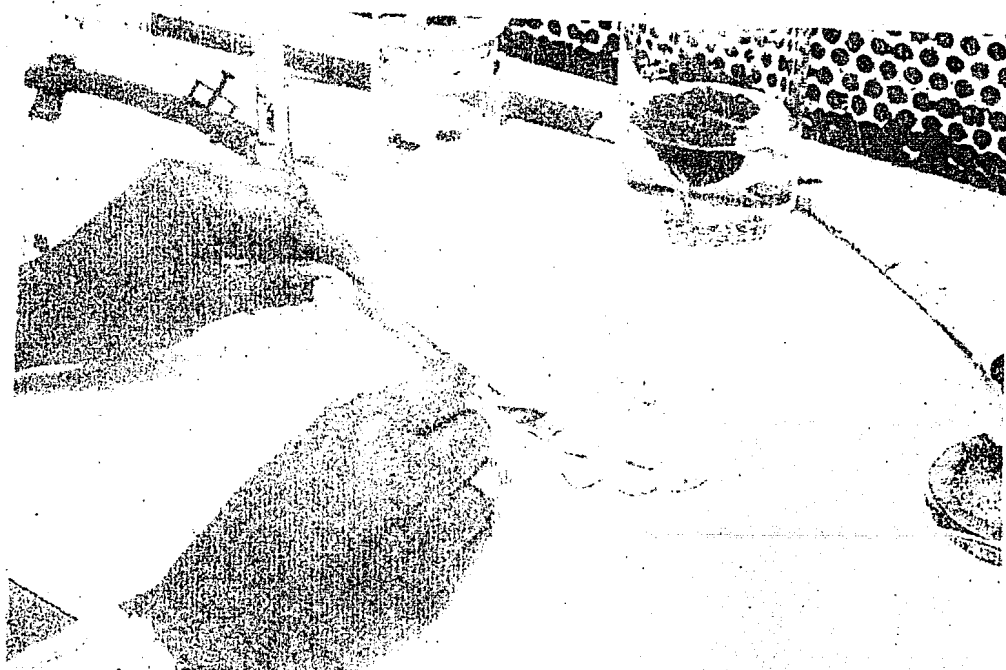


FIGURA 2 Corte de hoja de Violeta Africana

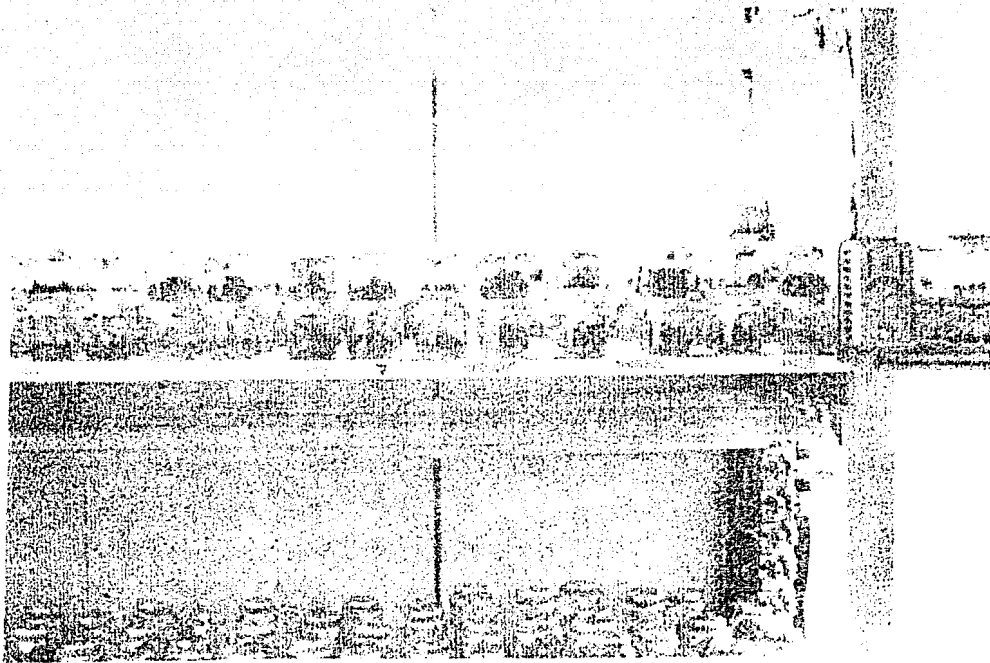


FIGURA 1. Condiciones Controladas de luz y Temperatura en la Cámara de Incubación.



FIGURA 4 Adaptación a Invernadero en Recipientes de Plástico.



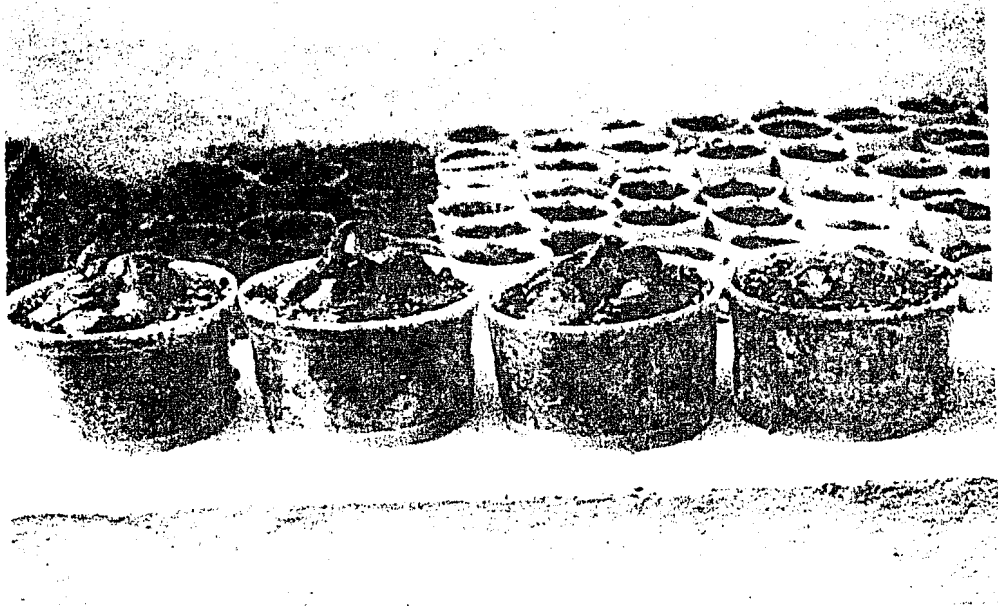


FIGURA . 5 Plantas Totalmente Adaptadas.

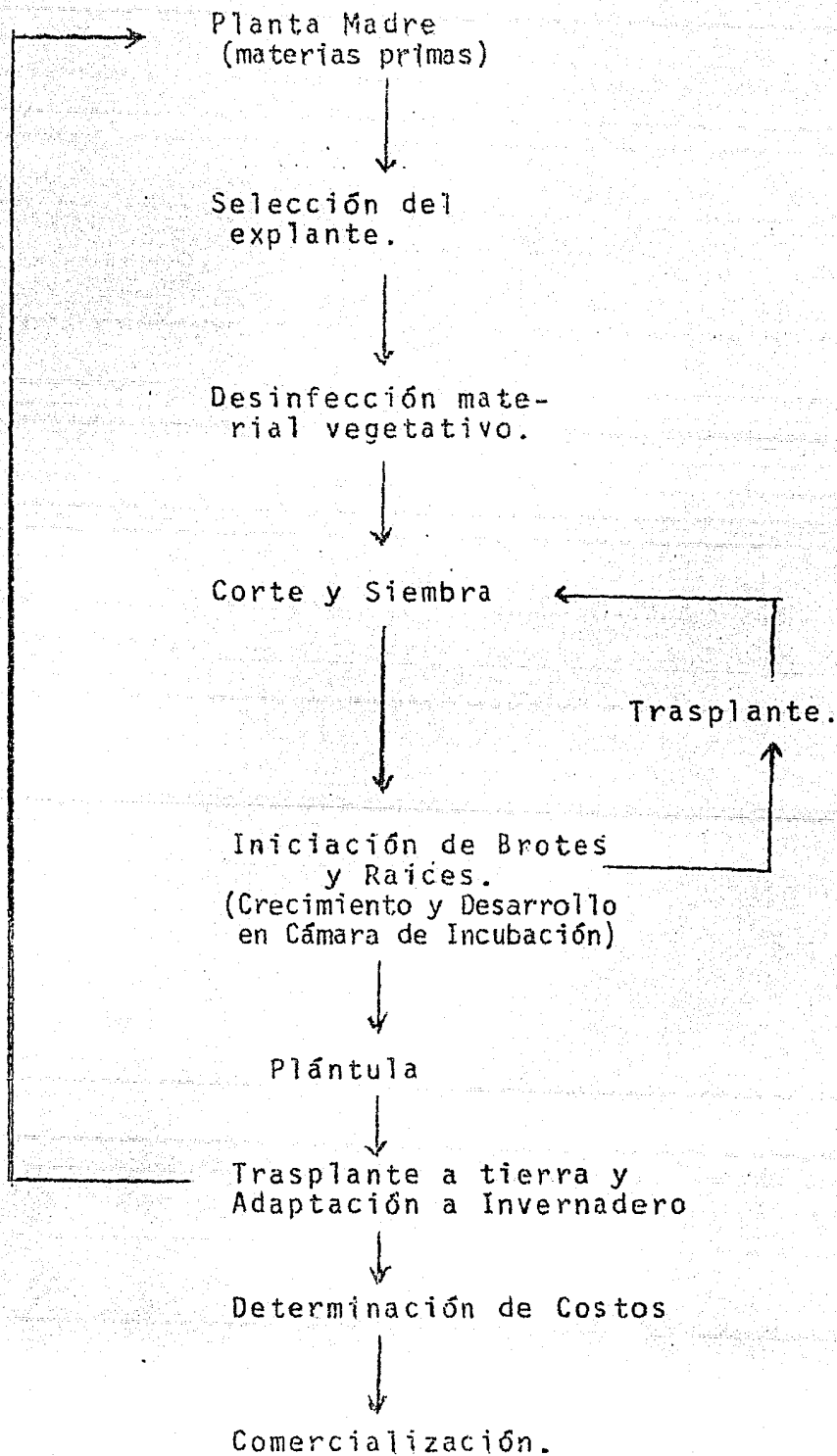




FIGURA . 7 Formación de Brotes Foliare y Posteriormente Plántulas en el medio MS sin hormonas y 0.2 de ANA con 0.005 de BAP (mg/l medio).



FIGURA . 8 Plántulas Completas, mostrando el Tejido Foliar Inicial.

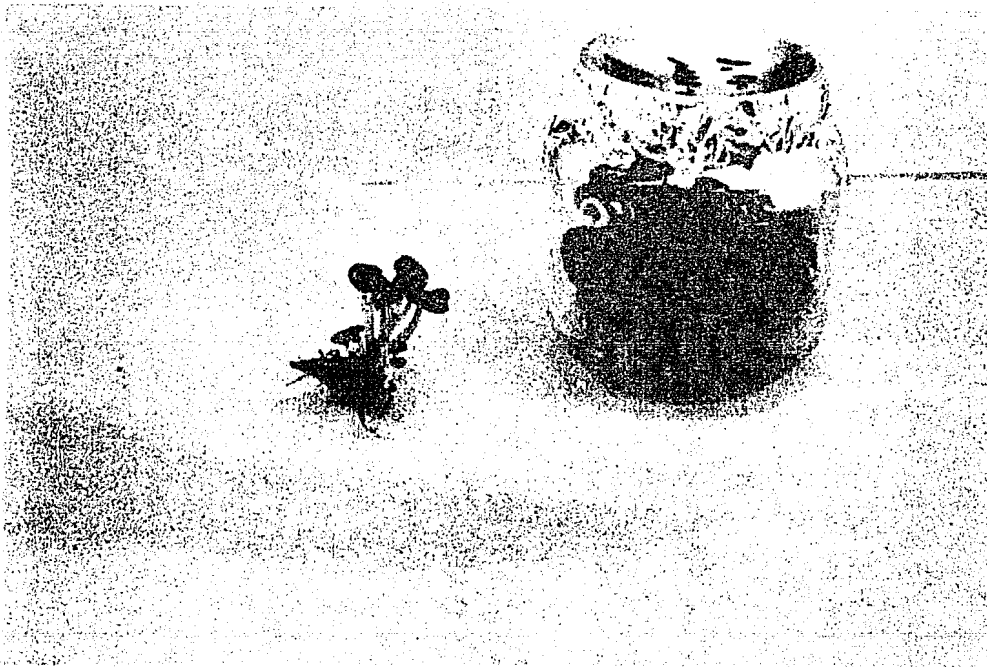


FIGURA . 9 Plántulas Completas.

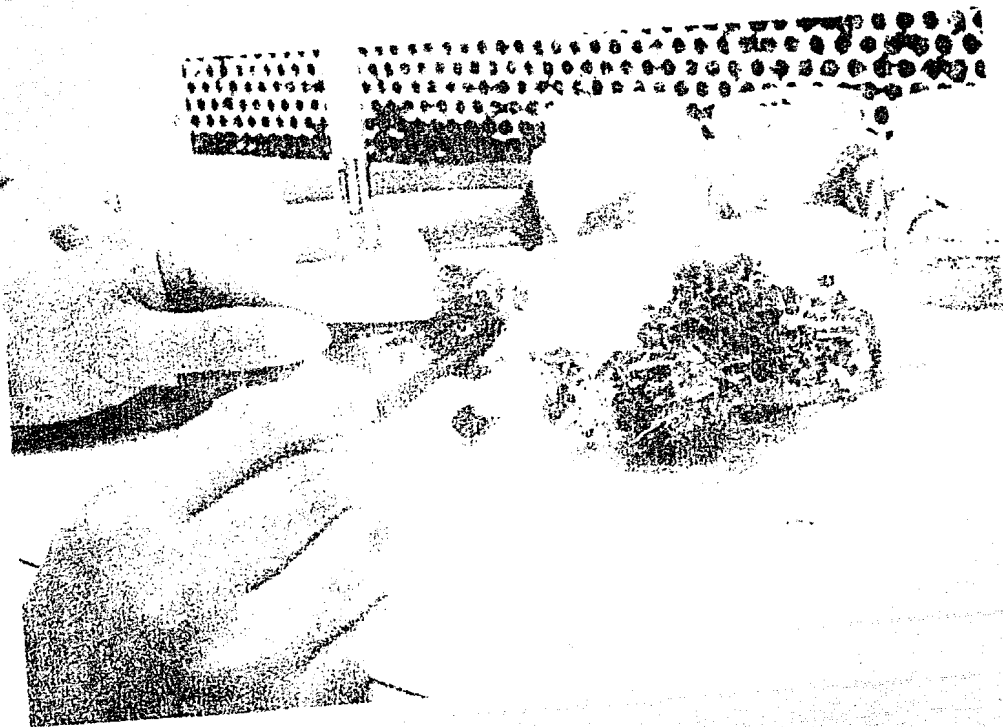


FIGURA 10 Separación de Plántulas del Tejido Inicial.

**COSTOS.**

## COSTOS.-

Una vez establecida la técnica de propagación masiva por cultivo *in vitro* en laboratorio, surge la necesidad de determinar el costo de producción, ya que frecuentemente se especula, que la metodología *in vitro* es altamente costeable; sin embargo pocas veces se ha realizado un estudio sobre este aspecto. Por esta razón el presente trabajo -- pretende ampliar el panorama sobre la veracidad del costo que implica establecer dicho cultivo; adelante se indican cuáles son los factores que influyen en el mismo, tomándose en consideración las limitaciones propias del trabajo.

El precio que se paga por la posesión o uso de un artículo, es -- comunmente considerado como el "costo" del mismo.

Los costos se aplican principalmente a problemas relacionados -- con la producción, debido a que en la mayoría de los casos, la producción requiere evitar, el desperdicio y procurar que los costos de los artículos no sean excesivamente altos en proporción a sus precios de -- venta.

Los factores del costo en la producción de violeta africana pueden dividirse en dos grupos.

- El primero comprende los egresos por material y trabajo que -- pueden ser directamente identificados con el producto final.

El costo combinado del material, la mano de obra directa se co -- noce como costo directo.

- El segundo grupo corresponde a los gastos indirectos y se re-- fieren a materiales y servicios esenciales en la obtención de un producto. (4).

Para la determinación del costo unitario de producción de vio-



leta africana se consideraron los siguientes aspectos:

- a) La propagación se realizó, bajo un diseño estadístico, con un número determinado de tratamientos y repeticiones, por lo que la producción obtenida fué limitada, obteniéndose hasta la adaptación a invernadero 900 plantas; esto implica la no utilización del laboratorio a toda su capacidad, ni la producción óptima de la planta.
- b) Se asume que el laboratorio está operando continuamente en la propagación de diferentes cultivos (1).
- c) Otro aspecto importante de mencionar es, que en este trabajo se pretende optimizar una metodología, probándose diferentes niveles hormonales, lo que implica incrementar los costos.

Para la obtención del costo unitario se dividieron en dos tipos de gastos: Directos e Indirectos.

Dentro de los costos denominados directos se encuentran: Mano de obra (salarios) y material, que son una parte integrante de la planta hasta la adaptación a invernadero (plantas madres, reactivos químicos, sustratos, macetas, etc.). El sueldo del responsable del trabajo debe absorberse totalmente por el período de trabajo, así como las prestaciones. Este está basado en un salario mensual de \$8,400.00 -- más aguinaldo.

En gastos indirectos, se incluyen los egresos por materiales, -- trabajo y otros servicios usados en el mantenimiento del equipo de laboratorio; que no pueden identificarse específicamente con las plantas se denominan gastos indirectos. Dentro de éstos se encuentran: Equipo de Laboratorio y material de cristalería, inmuebles, mantenimiento-reparación y servicios auxiliares. Al equipo se le consideró una depreciación anual del 1.5 y 7% dependiendo de su vida útil, estimándose

la depreciación mensual o cuota mensual. Dicha cuota se aplica a los meses de duración del experimento que en este caso fué por un año; los costos indirectos incluyen otros gastos por servicios (electricidad, - agua, gas), papelería, depreciación del equipo de laboratorio:

Costos Directos:

Las actividades realizadas fueron las siguientes:

- 1) Visitas a bibliotecas.
- 2) Revisión bibliográfica.
- 3) Preparación del medio nutritivo.
  - a) Stocks.
- 4) Preparación de material.
  - a) Vegetal
  - b) Cristalería.
- 5) Esterilización.
  - a) Vegetal.
  - b) Medio nutritivo.
  - c) Agua destilada y material de disección,
  - d) Recipientes.
  - e) Material contaminado.
  - f) Sustrato.
- 6) Siembra y trasplante.
- 7) Revisión, conteo y anotaciones en la cámara de crecimiento.
- 8) Preparación de sustratos.
- 9) Transplante a suelo.
- 10) Labores de Invernadero.

SUELDO ANUAL \$112,000.00

Material.- (Costo histórico a partir de enero de 1983; sujero a actua  
lización)

Vegetativo: Se utilizaron 10 violetas africanas cultivar  
"neptune", \$ 2,000.00.

REACTIVOS QUIMICOS: Utilizados para la preparación del medio  
Murashige y Skoog.

Concepto	Presentación	Costo \$	Requerimientos para 600 fras- cos.*	Costo por gramo para 600 frascos \$
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	500 gr	630.00	19.8 gr	24.95
$\text{KNO}_3$	500	958.00	22.8 gr	43.70
$\text{KH}_2\text{PO}_3$	500	1,120.00	2.04 gr	4.60
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	500	692.00	5.28 gr	7.30
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	500	694.00	4.44 gr	6.20
$\text{H}_3\text{BO}_3$	500	694.00	74.4 mg	0.10
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1 kg	1,336.00	267.6 mg	0.35
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	500 gr	490.00	103.2 mg	0.10
KI	250	1,268.00	9.96 mg	0.05
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	160	2,170.00	3.0 mg	0.07
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	500	1,190.00	0.3 mg	0.0007
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	100	2,800.00	0.3 mg	0.0084
$\text{Na}_2\text{EDTA}$	100	946.00	447.6 mg	4.23
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	500	656.00	333.6 mg	0.44
Myo-inositol	25	836	1.2 gr	40.12
Acido nicotínico	25	836.00	1.2 gr	40.12
Piridoxina·HCl	10	854.00	6.0 mg	0.50
Tiamina·HCl	25	856.00	1.2 mg	0.04
Glicina	100	730.00	24.0 mg	0.18
Sacarosa	1 Kg	1,540.00	360.0 gr	554.40

Continuación.-

Concepto.	Presentación	Costo \$	Requerimientos para 600 frascos *	Costo por gramo para 600 -- frascos \$
Agar - Agar	100 gr	1,004.00	96.0 gr	936.84
6 BAP	100	3,700.00	0.5 mg/100ml	0.018
ANA	5	32,805.00	10 mg/100 ml	6,56
IBA	5	2,022.00	10 mg/100 ml	4,04.

COSTO REACTIVOS QUIMICOS

\$ 1,661.84

(\*) Cada frasco con 20 ml, contando 4 trasplantes, incluyendo Contaminación.

SUMINISTROS DE OPERACION:

COSTO \$

Sustancias empleadas para la desinfección (alcohol etílico, hipoclorito de calcio, detergente)	600.00
Navajas de bisturí	115.00
Papel filtro	300.00
Papel Parafilm	300.00
Ligas	60.00
Papel Aluminio	1,050.00
Frascos	600.00
Papel secante	300.00
Sustratos (Tierra de hoja, negra y agrolita).	2,300.00
Macetas	5,000.00
Material para limpieza	3,700.00
Indumentaria de trabajo	2,500.00

Total

16,825.00

Estos gastos por sus características son absorbidos por la producción en su totalidad.

COSTO TOTAL DIRECTO

\$132,486.84

TIPO DE COSTO	CONCEPTO	COSTO \$	SUBTOTAL \$	TOTAL \$
<b>DIRECTO:</b>				
	Sueldo	100,800.00	112,000.00	
	Aguinaldo	12,000.00		
	Material:			
	Vegetativo	2,000.00		
	Reactivos -			
	Químicos	1,661.84		
	Suministros			
	de Operación	16,625.00		
			20,486.84	
				132,486.84
<b>INDIRECTOS:</b>				
	Equipo I	250,700.00		
	7% Depreciación			
	anual	17,700.00		
	Equipo II	170,452.00		
	5% Depreciación			
	anual	8,522.60		
	Equipo III	10,670.00		
	1% Depreciación			
	anual	106.70	26,320.30	
	Mantenimiento y			
	reparación	21,521.00	21,521.00	
	Servicios Auxi-			
	liares		2,706.00	
				50,026.30

COSTOS INDIRECTOS:

Equipo I

Concepto,	Costo \$
Autoclave	60,000.00
Cámara de Flujo Laminar	40,000.00
Estantes	5,000.00
Refrigerador	22,000.00
Balanza Analítica	117,500.00
Balanza granataria	6,200.00
TOTAL	250.700.00
Depreciación anual 7%	17,549.00

Equipo y Material II

Potenciómetro digital	103,000.00
Timer	2,391.00
Destilador	28,412.00
Parrillas agitadoras .	6,000.00
Cristalería (Cuadro No. 8)	30,648.00
TOTAL	170,452.00
Depreciación anual 5%	8,522.60

Equipo y Material III

Focos Tubulares Gro Lux	8,000.00
Recipientes de plástico	500.00
Rejas de madera	100.00
Tamiz malla	2,070.00
Total	10,670.00
Depreciación anual 1%	106.70

CUADRO NO. 8. Material de Cristalería.

Descripción	Costo por Unidad.	Cantidad a Utilizar	Costo Total \$
Caja Petri 100x10	105	1	105
Pipeta 2 ml	186	2	372
Pipeta 5 ml	186	2	744
Pipeta Vol. 5 ml	231	2	462
Probeta para prueba de tierra 1000 ml	1925	2	3,850
Probeta graduada 100 ml	615	2	1,230
Matraz Redondo fondo plano	625	2	1,250
Matraz Erlenmeyer, boca ancha 2000 ml	520	2	1,040
Vaso de precipitado 100 ml	73	4	292
Vaso de precipitado 600 ml (Kimax)	106	2	212
Frasco ambar de 1000 ml	176	2	352
Frasco ambar de 125 ml	94	2	188
Desecador con tapa para vacío 20 cm de diámetro	9600	1	9,600
Micropipeta 1 ml	572	1	572
Embudo de Filtración con tallo	309	1	309
Matraz Erlenmeyer 125 ml boca ancha	122	10	1,220
Matraz aforado 100 ml	570	2	1,140
Micropipeta	7,500	1	7,500

TOTAL material de Cristalería

\$ 30,648.00

Mantenimiento y Reparación.-

El mantenimiento y reparación se consideró el 5% de la inversión fija (costo del equipo)

Equipo I	250,700.00	
Equipo II	170,452.00	
Equipo III	10,670.00	
<b>Total</b>	<b>431,822.00</b>	
	<b>Mantenimiento 5%</b>	<b>21,591.00</b>

Servicios Auxiliares.-

Agua (0.8 m<sup>3</sup>/ Día) (7días) (53 semanas) = 296.8 m<sup>3</sup>.  
 m<sup>3</sup> = 15 cvs. \$ 44.53

Electricidad Cámara de incubación con tres lámparas  
 (40 watts) (16 hrs de luz) = 1.9 kw.

(1.9 Kw) (7) (53)= 704 Kw/h/año \$ .27) = 190.00

Equipo: 450 Kw año \$0.27)= 121.50

Gas: 506 litros/año a 5.00 litro de gas= 2,350.00

**COSTO TOTAL INDIRECTO 50,626.33**

Gastos Directos.= Costo Unitario Directo (C.U.D.)  
 No. de Unidades.

137,486.84 = \$147.20  
 900 C.U.D. \$147.20

Gastos Indirectos= Costo Unitario Indirecto (C.U.I.)  
 No. de Unidades.

50,626.33 \$56.25  
 900 C.U.I. \$ 56.25



C.U.D. + C.U.I. = Costo Unitario Total (C.U.T.)

$$147.20 + 56,25 = \$203,45$$

C.U.T. \$203.45

El costo por planta se considera igual con respecto a los precios encontrados en el mercado.

Sin embargo, considerando las limitaciones del trabajo mencionados anteriormente, los datos aquí presentados, dan idea de los costos manejados en laboratorio, pudiendo contribuir en trabajos donde el volumen de producción y el aprovechamiento integral de las instalaciones sea el óptimo.

Por otro lado, las plantas producidas *in vitro*, presentan una -- calidad superior, ya que son libres de enfermedades producidas por hongos y bacterias, el follaje es muy abundante, presentan forma de roseta y florecen sin luz artificial, siendo mayor el número de flores.

## CONCLUSIONES.-

## CONCLUSIONES.-

- 1.- Dado que no hubo interacción entre las auxinas y citocininas, - en la inducción a brotes y por consiguiente a plántulas, se podría utilizar cualquiera de los reguladores de crecimiento; - siendo indiferente la concentración del ANA, mientras que para el BAP, en la concentración de 0.01 mg por litro de medio, se obtuvo un mejor número de brotes, pudiéndose seleccionar la más accesible, repercutiendo entonces, en el costo de producción.
- 2.- Aunque el ANOVA indique que no hay interacción entre los reguladores de crecimiento, se ve la necesidad de añadir ANA para favorecer el desarrollo vegetativo.
- 3.- Se recomiendan intensidades luminosas iguales o más altas, ya que favorece la inducción de brotes foliares e incrementa el vigor en las hojas.
- 4.- El tiempo de producción de plántulas por cultivo *in vitro* de -- *Saintpaulia ionantha* Wendl, cultivar "Neptune", en explantes de hoja fué de 4-6 meses.
- 5.- El tejido de hoja de violeta africana del cultivar "Neptune" -- presenta una gran potencialidad de regeneración por cultivo *in vitro*, ya que con la adición de auxinas o citocininas, se forman plántulas.
- 6.- La adaptación a invernadero después del trasplante de *in vitro* a *in vivo*, resultó en un 85% de efectividad. Debido a que la mayor pérdida fué por oxidación en tejidos jóvenes, se recomienda realizar el trasplante cuando la planta no está madura.
- 7.- En lo que respecta al estudio del costo de producción, en el caso de investigación, los costos unitarios se elevan. Sin em--

bargo, una vez establecido el equipo de laboratorio, llevando a -  
cabo programas de propagación masiva de violeta africana, junto -  
con otros cultivares que presentan alta potencialidad en la rege-  
neración y aceptación en el mercado; así como la realización de -  
un estudio económico multidisciplinario, sugiere que el procedi-  
miento por cultivo *in vitro* puede ser usado como la base de un --  
rentable, rápido y confiable método de propagación.

## BIBLIOGRAFIA.

BIBLIOGRAFIA.-

- 1.- Anderson W.C., Meagher G.W., 1977.- Cost of propagating broccoli plants through tissue culture. Hort. Sci 12(6): 543-4.
- 2.- Bilkey, P.C. Cooking, E.C. 1981.- Increased plant vigor by *in vitro* propagation of *Saintpaulia ionantha* Wendl, from subepidermal tissue. Hort. Sci. 12(2): 127-130.
- 3.- -----, Mc Cown, B.H.; Hildebrandt, A.C. 1978.- Micropropagation of African violet from petiole cross-sections. Hort. - Sci, 7(3): 289-290.
- 4.- Burton, N. L. 1965.- Contabilidad de Costos F.C.E. 5a. ed. México; 304 pp.
- 5.- Cooke, C.R. 1977.- Tissue culture propagation of African violets Hort. Sci. 12(6): 549.
- 6.- Devlin, R.M. 1970.- Fisiología Vegetal. Ed. Omega. Barcelona; - 614 p.
- 7.- D.Fossard, R.A. 1976.- Tissue culture for plant propagators. - New England Australia.
- 8.- Everet, N. P. et al. 1978.- Hormone regulation of cell growth - and development *in vitro* In. Frontiere plant tissue cultures Ed. Stherpland. IAPTC: 307 p.
- 9.- Hartman, H.T.; Kester, D.E. 1981.- Propagación de plantas. Ed. CECSA. México 814. p.
- 10.- Hernández, P.L. 1981.- Propagación masiva in vitro de dos cultivos de violeta africana Saintpaulia ionantha Wendl, Tesis - U.N.A.M. Fac. Ciencias: 80 p.

- 11.- Hughes, K. W., et al. 1975.- Anther-derived haploids of the African Violets. Jour. Bot. 53: 1442-1444.
- 12.- Hoigate, P. 1977.- Propagation of ornamentals by tissue culture In. Plant Cell and organ culture. Ed. Reinert y Bajaj. -- New York. 18-43.
- 13.- Hushey, G. 1980.- *In vitro* propagation. In Tissue Culture - - Methods for plant pathologist. Eds. Ingram y Helgeson. - Blackell Oxford. 54-59.
- 14.- Ingram, D.H.; Helgeson, J P. 1980.- Tissue Culture Methods for Plant Pathologist. Blackwell, Sci. Pub. Oxford: 3-76.
- 15.- Jacobs. W.P., 1979.- Plant hormones and plant development ' Cambridge. University Press 110:130.
- 16.- Jimenez J., 1982.- Comunicación personal. Herbario. Fac. Ciencias U.N.A.M.
- 17.- Kenneth, H. 1975.- Floral Facts. Department of vegetable crops University of California: 1-4.
- 18.- Kent, 1980.- Saintpaulia ionantha, Wendl In. Introduction to Floriculture. Ed. Larson. Ed. Academic. Press.
- 19.- Larson, 1980.- Introduction to Floriculture. Academic Press.- New York. 607 p.
- 20.- Levine, B. S.- 1982.- Desarrollo Metodológico para la propagación vegetativa in vitro del aguacatero. Tesis UNAM. Iztacala. 97 p.
- 21.- Maramorosh, K. 1977.- The Atlas of insect and plant viruses.

Acad. Press. Vol. 8:181-196.

- 22.- Milleti, G. 1966.- Note sulla (Violeta Africana). Frutticoltura 68: 491-500.
- 23.- Murashige, T. 1974.- Plant propagation through tissue cultures - Ann. Rev. Pl. Phys. 25:135-166.
- 24.- ----- Skoog, F. 1962.- A revised medium for rapid growth - and bioassays with tobacco tissue cultures. Phy. Plnt. 15-473-497.
- 25.- Naylor, E.E., Johnson B., 1937.- A Histological study of vegetative reproduction in *Saintpaulia ionantha*, American Jour. -- Bot. 24:673-678.
- 26.- Overbeck J., 1966.- Plant hormones and regulation. Science. -- 152:721-730.
- 27.- Pantone Martching, 1963.- Pantone color Specifier.- Pantone - Inc. New Jersey.
- 28.- Pirone, P. 1978.- Diseases and pest of ornamental plants. 5a.- Ed. - Ed. John Wiley and Sons. USA<sup>o</sup> 13-49.
- 29.- Rojas, G.M. 1979.- Fisiología vegetal aplicada. Ed. McGraw Hill 2a. Edición. México 262 p.
- 30.- Start, N. Cumming. B. 1976.- *In vitro* Propagation of *Saintpaulia ionantha wendl.* Hort. Science 11(3): 204-206
- 31.- Street, H.E. 1974.- Tissue culture and plant Science. Ed. Ac. Press, New York. 42-355.



- 32.- -----; Yeaman, M.M. 1977.- Plant tissue and cell cultures.  
Blackwell, Sci. Publ. England: 137-262.
- 33.- Thorpe, T.A., 1978.- Physiological and biochemical aspects of-  
organogenesis *in vitro* In: Frontiers in plant tissue culture  
Ed. Thorpe and IAPIC: 307 p.
- 34.- Thomas, E. Davey, M.R. 1975.- From single cells to plants. -  
Whikeham, publications. London 172 p.
- 35.- Vázquez, A.M.; Davey, M.R.; Short, C.K. 1977.- Organogenesis in  
culture of *Saintpaulia ionantha* Act. Hort. 78:249-255.
- 36.- Went, F.W. 1957.- Las Plantas. Time-Life. 2da. Edición, México  
194 p.