

Producción masiva de vitroplantas de *Violeta africana* (*Saintpaulia ionantha* Wendl.) en el Jardín Botánico Nacional.

Niurka Morffi González*, Marta Arteaga Amador*, Esperanza Peña García*, Ramón O. Martínez Zubiaur**, Zoraida Torriente Campos* y Dalia Pérez Montesino*.

* Jardín Botánico Nacional, Universidad de La Habana

** Instituto de Ciencia Animal

RESUMEN

Se utilizó un Banco de Plantas establecido en el Jardín Botánico Nacional constituido por especímenes adultos de cuatro variedades de *Saintpaulia ionantha* Wendl. para la propagación masiva *in vitro* a partir de fragmentos de hoja.

Se establece un esquema de desinfección que combina el desinfectante cubano BENZALCONIO con alcohol y cloro comercial para la obtención de resultados altamente satisfactorios (>98%); se comprobó que el medio nutritivo y condiciones de cultivo aplicados anteriormente a *Fragaria x ananasa* (Martínez y col., 1985) producen una respuesta de iniciación de brotes en cuatro semanas; que los brotes pueden subcultivarse tres veces sin que se produzca vitrificación en más del 95% de las vitroplantas resultantes; y que el sustrato (humus: arena silícea en proporción 2:1) y condiciones en que se realiza la aclimatización y primeras fases de crecimiento en túnel utilizado resultan efectivos en un 100%. Se discuten los resultados.

Palabras clave: *Violeta africana*, *Saintpaulia ionantha*, producción masiva, micropropagación, aclimatización

ABSTRACT

An established Bank of Plants of adult specimens of four varieties of *Saintpaulia ionantha* Wendl. in the National Botanical Garden was used for *in vitro* propagation by leaf fragments.

Disinfection scheme combining the Cuban product BENZALCONIO with alcohol and commercial sodium hypochloride for obtention of highly satisfactory results (>98%) was established; the effect of nutritive medium and culture conditions previously applied to *Fragaria x ananasa* (Martínez et al., 1985) for initiating shoot formation in four weeks was proved; the possibility of three subcultures of initiated material without vitrification in more than 95% of the resulting vitroplants was obtained; and that the tested substrate (humus: silica sand in proportion 2:1) and conditions applied for acclimatization and initial growth in tunnel conditions are effective in 100%. Results are discussed.

Key words: African violet, *Saintpaulia ionantha*, massive production, micropropagation, acclimatization.

INTRODUCCION

La familia *Gesneriaceae* cuenta con innumerables representantes de apreciable valor ornamental entre los que se destacan por su delicada belleza las distintas variedades de *Violeta africana* (*Saintpaulia ionantha* Wendl.).

La especie, caracterizada por un tallo corto del que se originan hojas de textura aterciopelada dispuestas en roseta y cuyas flores presentan una gama de colores y caracteres de la corola que determinan su alto valor ornamental puede cultivarse bajo techo con una acertada combinación de sustrato, humedad, luz y temperatura.

Las violetas africanas se comercializan mundialmente (Bilkey et al., 1978) usando las técnicas de cultivo *in vitro* con gran éxito. En Cuba, su propagación masiva *in vitro* se realiza a partir de tecnologías establecidas; pero la aparición de plantas vitrificadas, y fundamentalmente la baja supervivencia que se logra durante la fase de aclimatización bajo las condiciones en que se realiza

hacen que los rendimientos del proceso disminuyan considerablemente.

Con los objetivos de contribuir a la recuperación de algunas de las variedades de *Violeta africana* incluidas en la colección del Jardín Botánico Nacional y de obtener material homogéneo de alta calidad para su comercialización, el presente trabajo reporta un esquema de producción masiva factible aplicado a cuatro variedades con alto porcentaje de supervivencia *in vivo*.

MATERIALES Y METODOS

Obtención de explantos axénicos

Se utilizó como fuente de obtención de explantos un banco de plantas adultas de cuatro variedades de *Violeta africana* (*Saintpaulia ionantha* Wendl.), sanas y vigorosas que se cultivaron durante un año en la Unidad de Cultivo *in vitro* del Jardín Botánico Nacional. Las variedades con flores de color azul (V1), violeta (V2), blanco (V3) y malva (V4), fueron cultivadas en condiciones

semicontroladas, con luz filtrada al 70%, riego diario y temperatura ambiental, en macetas con sustrato de composición conocida (humus: arena silíceo en proporción 2:1) para su desarrollo óptimo.

Para la iniciación *in vitro*, se cosecharon hojas maduras de cada variedad, y se sometieron a dos esquemas de desinfección: **C-MEB** y el **CB-NS** (Tabla I).

TABLA I

Esquemas de desinfección aplicados a las hojas maduras de *Saintpaulia ionantha* Wendl.

ESQUEMA C-MEB

- * Lavado de las hojas con abundante agua corriente.
- * Lavado con solución antiséptica y detergente de Clorhexidina y Methyl-ethyl-benzalconio (2%).
- * Enjuague con agua de la llave.
- * Enjuague con agua destilada no estéril.
- * Enjuague con agua destilada estéril (3 veces).
- * Inmersión durante 1' en alcohol al 70%
- * Enjuague con agua destilada estéril (3 veces).
- * Inmersión durante 10' en lejía comercial Cloralex (6% de cloro activo) al 10%.
- * Enjuague con agua destilada estéril (3 veces).

ESQUEMA CB-NS

- * Lavado de las hojas con abundante agua corriente.
- * Lavado con solución desinfectante al 10% de BENZALCONIO (20% de cloruro de benzalconio y 0,2% de nitrito de sodio)
- * Enjuague con agua de la llave.
- * Enjuague con agua destilada no estéril.
- * Enjuague con agua destilada estéril (3 veces).
- * Inmersión durante 1' en alcohol al 70%
- * Enjuague con agua destilada estéril (3 veces).
- * Inmersión durante 20' en lejía comercial Kinsol (2,5% de cloro activo) al 15%.
- * Enjuague con agua destilada estéril (3 veces).

Para obtener los explantos se descartaron el pecíolo, el nervio central y el borde del limbo foliar. La superficie útil se seccionó en fragmentos cuadrados de 0,8-1,0 cm (Fig. 1).

Iniciación

Los explantos obtenidos se inocularon en frascos de cristal transparente y de tapa metálica de rosca, sellados con cinta autoadherente Kleen pack y en tubos de cultivo, conteniendo 25 y 5 mL de medio nutritivo respectivamente. El medio de iniciación reportado antes (Martínez y col., 1985), en el que se suplementa al medio MS (Murashige y Skoog, 1962) con fitohormonas a concentraciones que estimulan la iniciación (0,25 mg/L⁻¹ de BA, 0,2 mg/L⁻¹ de IBA y 0,03 mg/L⁻¹ de GA3) fue aplicado sin modificación. Se inocularon un explanto

por tubo y cinco explantos por frasco de manera tal que la superficie del haz quedara en contacto directo con el medio de cultivo. Se aplicaron condiciones controladas para la iniciación de brotes: luz artificial continua de 3000-4000 lux y temperatura de 26±2°C durante 4 semanas.

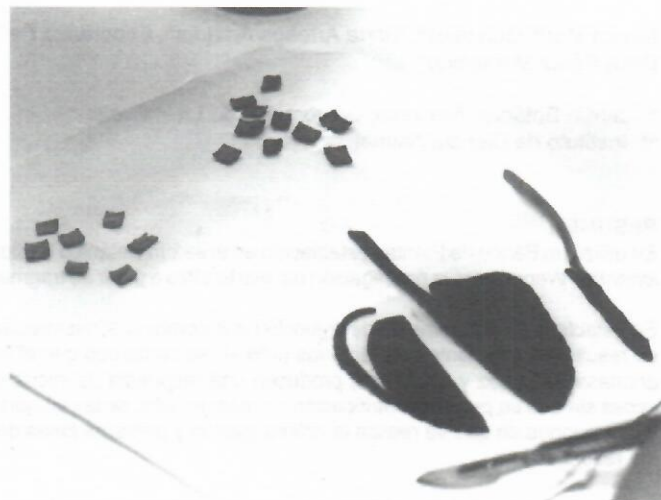


Figura 1: Obtención de explantos de *S. ionantha* (V2) de 0,8-1,0 cm a partir de la superficie foliar previamente desinfectada en condiciones estériles.

Multiplicación

Los explantos iniciados se fragmentaron en 3-4 porciones dependiendo de la intensidad de la brotación y se trasplantaron al mismo medio MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con 2,5 mg/L⁻¹ de BA que ha estimulado la multiplicación en otros cultivos (Martínez y col., 1985). Para el desarrollo de esta fase se utilizaron únicamente los frascos de cristal transparente conteniendo 40 mL de medio nutritivo, a razón de 2-3 fragmentos/frasco. Se realizaron subcultivos cada 4 semanas para evaluar la potencialidad de esta fase por supervivencia de los brotes y vitrificación.

Enraizamiento

Los grupos de brotes fueron divididos y subcultivados durante 4 semanas bajo las condiciones de la fase precedente en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) a la mitad de su concentración suplementado con 0,25 mg/L⁻¹ de BA y 0,2 mg.L⁻¹ de NAA, razón de 5-8 grupos/frasco.

Aclimatización

Las vitroplantas se individualizaron y se separaron en dos grupos atendiendo a la talla alcanzada: **G1**, tallas de 1,1-2,0 cm; **G2**, tallas de 0,5-1,0 cm.

Las vitroplantas G1 se plantaron en bandejas de aluminio y las G2 en bandejas de poliespuma, conteniendo como sustrato una mezcla de humus: arena silíceo en

proporción 2:1, cuyos componentes fueron previamente pasados a través de un tamiz de 3,5 mesh a fin de garantizar un tamaño de partícula homogéneo. La aclimatación se realizó bajo iguales condiciones a las aplicadas al banco de plantas pero al 100% de humedad relativa durante las primeras tres semanas, lograda por su permanencia en un túnel de nylon transparente cerrado a manera de cámara húmeda. La efectividad del procedimiento aplicado para la aclimatación fue evaluada en dos épocas: mayo y enero. Se realizó una prueba adicional, eliminando la cámara húmeda, a las vitroplantas aclimatizadas en mayo.

Al culminar la fase, se evaluó el porcentaje de supervivencia en cada grupo de 200 vitroplantas.

Crecimiento en túnel y trasplante

Una vez aclimatizadas las vitroplantas, se eliminó la cámara húmeda y se mantuvieron en túnel con riego por aspersión diario durante dos meses. Se evaluó la supervivencia de las vitroplantas, el diámetro alcanzado por la roseta de hojas y su altura.

Después de evaluadas, las vitroplantas se trasplantaron a macetas plásticas de 8,0 cm de diámetro y 6,5 cm de profundidad, conteniendo el mismo sustrato de procedencia y régimen de riego. Se controló la supervivencia de las vitroplantas al trasplante.

RESULTADOS Y DISCUSION

En el presente se cuenta con una gran experiencia en el cultivo *in vitro* de las violetas africanas.

El proceso productivo se realiza con gran éxito en varios países, donde inclusive se ha introducido la automatización al sistema. En Francia por ejemplo, la producción anual de este ornamental ha llegado a representar aproximadamente el 50% de las plantas obtenidas por cultivo *in vitro* con un valor de 15 millones (Bouziques, 1987). Por otra parte, en América del Norte la producción comercial de violetas se eleva a un millón y medio de vitroplantas anualmente (Zimmerman y Barnhil, 1991). Sin dudas, el procedimiento para la producción biotecnológica automatizada reportado a finales de los años ochenta (Levin et al., 1988) se relacionó a las cifras alcanzadas.

La automatización, se ha realizado utilizando biorreactores de 10 - 50 litros con aereación, utilizando un bioprocesador que selecciona y dispersa el tejido y el medio nutritivo a razón de 100,000 propágulos en 8 horas; de otra parte, al sistema se acopla una máquina capaz de colocar las vitroplantas en el sustrato a una velocidad de 8000/hora, con lo cual pudo reducirse el costo de producción total en un 60% por planta. Entre

las plantas obtenidas satisfactoriamente se citan las violetas africanas.

Sin embargo, las mayores dificultades para establecer un sistema continuo de producción masiva de plantas de alta calidad, recaen en la contaminación, en los porcentajes de vitrificación y en la fase de aclimatación en sustrato, independientemente del volumen de vitroplantas a producir y que el sistema aplicado sea automatizado o no.

El procedimiento aplicado en el presente trabajo pone de manifiesto que cualquiera de los dos esquemas de desinfección aplicados permite obtener explantos axénicos, pero mientras que con el esquema **CB-NS** se obtiene un 98% de explantos axénicos, con la aplicación del esquema **C-MEB** los rendimientos globales se ven afectados significativamente por la contaminación y muerte del tejido en un 25%.

Otro aspecto de interés en la micropropagación de las violetas es su respuesta a la iniciación a partir de distintos explantos. Aunque las violetas constituyen un ejemplo de micropropagación a partir de yemas adventicias (Bilkey et al., 1978) que se originan en las secciones transversales de peciolo, el limbo foliar desprovisto del nervio central y del borde, seccionado en cuadrados e inoculado horizontalmente, también produce resultados altamente satisfactorios. La totalidad de los explantos axénicos respondió al medio nutritivo y condiciones de cultivo aplicados en la fase de iniciación.

Los resultados obtenidos utilizando frascos de cristal y tubos de cultivo conteniendo 25 y 5 mL de medio nutritivo respectivamente durante la fase de iniciación fueron altamente satisfactorios. Sin embargo, para una producción comercial, es preferible la inoculación de explantos en los frascos de cristal utilizados en las restantes fases *in vitro*, con 5 explantos por frasco conteniendo 25 mL de medio nutritivo para lograr una mayor celeridad en el proceso y facilidad de manipulación posterior.

En el presente trabajo se aplicaron el medio nutritivo y condiciones de cultivo probadas con anterioridad con el objetivo de evaluar las pérdidas por vitrificación que ocurren fundamentalmente durante la fase de multiplicación. Los resultados obtenidos revelaron que a partir del tercer trasplante en medio de multiplicación se obtienen respuestas morfogénicas diversas, tales como pequeños callos y raicillas finas sobre las hojas de los nuevos brotes, así como plegamiento de las nuevas hojas que dan a los brotes un aspecto diferente al de la planta normal. El efecto, igual en todas las variedades utilizadas, se incrementa bruscamente a partir del tercer trasplante, en que el 60% de las vitroplantas, como promedio, pre-

sentan estas anomalías. Es por ello que para garantizar una producción de plantas sanas y vigorosas sin modificaciones en su fenotipo no deben realizarse más de tres multiplicaciones *in vitro* a partir del material iniciado.

La técnica aplicada permite obtener, como promedio, 40 vitroplantas a partir de cada porción utilizada como explanto axénico en cada multiplicación (Fig. 2), cantidad que se incrementa exponencialmente de acuerdo al número de multiplicaciones que se haga, hasta tres.



Figura 2: Vista parcial de los brotes aéreos de *S. ionantha* (V2) sobre medio MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con 2.5 mg/L de BA durante la fase de multiplicación.

El 100% de los brotes enraízan satisfactoriamente con el medio nutritivo y condiciones de cultivo aplicados y a las cuatro semanas pueden ser pasados a la fase de aclimatización.

La aclimatización puede considerarse altamente satisfactoria tanto para las plantas con talla entre 1,1-2,0 cm (Grupo 1) como para aquellas que oscilan entre 0,5-1,0 cm (Grupo 2). De acuerdo a la metodología aplicada, para tallas mayores (Grupo 1) se logra un ligero incremento (3%) respecto al 95% de supervivencia logrado en las de menor tamaño (Grupo 2). Los resultados alcanzados son de gran utilidad práctica para la puesta en marcha de un sistema de producción *in vitro* de violetas con fines comerciales a pequeña escala, además de permitir la evaluación del potencial de esta tecnología a mayor escala en biofábricas.

Debe señalarse no obstante, que las vitroplantas que iniciaron esta fase en la época de lluvia, pudieron cultivarse eliminando la cámara húmeda, lo que, evidentemente, se relaciona con la elevada humedad ambiental. Sin embargo, la instalación debe contar con condiciones que eviten la lluvia directa sobre el material

micropropagado.

Al cabo de 1,5-2,0 meses, tiempo requerido para el crecimiento en túnel y trasplante, las vitroplantas alcanzaron un diámetro en roseta de hojas de 4 cm y una altura que osciló entre 2,0-3,0 cm, independientemente de la variedad. Es importante hacer notar la celeridad en el ritmo de crecimiento en los dos meses posteriores al trasplante a macetas (Fig. 3). Durante este período se triplica el diámetro de la roseta de hojas y se incrementa la altura del fronde hasta 3,0 cm; a los seis meses de edad, las vitroplantas logran alcanzar 16,0 cm de diámetro en su roseta con 7,0 cm de altura como promedio.



Figura 3: Vitroplantas aclimatizadas de *S. ionantha* (V2), después de dos meses del trasplante a macetas con el sustrato seleccionado (humus:arena silíceo, en proporción 2:1).

El cultivo en macetas con las condiciones descritas, posibilita un 100% de supervivencia de vitroplantas sanas y vigorosas. La etapa de floración comienza después de seis meses de realizado el trasplante a condiciones *in vivo* y puede permanecer durante todo el año.

AGRADECIMIENTO

Los autores desean expresar su agradecimiento a Pedro Alvarez, fotógrafo del Jardín Botánico Nacional por su colaboración.

BIBLIOGRAFIA

Bilkey PC, Mc Cown BH, Hildedrandt AC. 1978. Micropropagation of African Violets from petiole cross sections, Hortscience. 13:37-38.

Bouziqes P. 1987. La production de vitroplants pour l'horticulture ornamentale en France, PHM-Revue Hortic. 277:15-23.

Douglas GD. 1990. Methods in Molecular Biology Vol.6 Plant Cell and Tissue Culture. Cap.8. Manipulación de la formación de tallos en explantos cultivados. 71-79.

Hughes KW, Bell SL and Caponetti IV. 1975. Another derived haploids of the African violet. Can. J. Bot. 53:1442-1444.

Jimenez J y Caballero M. 1990. El cultivo industrial de plantas en maceta. Ediciones de Horticultura, SL.Litoclub, S.A., Barcelona.

Levin R, Gaba V, Tal B, Hirsh S, Nola DÑ and Vasil IK. 1988. Automated plant tissue culture for mass propagation. Bio/Technology. 6:1035-1040.

Martinez RO, Fuentes Z y Morffi N. 1985. Tecnología para la propagación acelerada de *Fragaria x ananasa*. (inédito)

Murashige T and Skoog F. 1962. A revised medium for

rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15:473-497.

Start M and Cunaming. 1976. In vitro propagation of *Saintpaulia ionantha* Wendl. Hn. Sci. 11:204-206.

Vázquez AM, Davey MR and Short KC. 1977. Organogenesis in culture of *Saintpaulia ionantha* Wendl. Acta Horticulture. 78:249-258.

Zimmerman RH and Barnhill Jones J. 1991. Comercial micropropagation in North America. En: Micropropagation of Higher Plants, P. C. Debergh and R.H. Zimmerman eds., pp 171-189.

Recibido: 27 de marzo de 1998.

Direcc. de los autores: * Jardín Botánico Nacional, Carretera del Rocío km 3 1/2, Calabazar, Boyeros, Ciudad de La Habana. CP 19230. ** Instituto de Ciencia Animal