

# Micropropagación y organogénesis *in vitro* de gloxinia

Silvana Alvarenga <sup>1</sup>  
Ana Abdelnour <sup>1</sup>

## Resumen

Se estableció un protocolo para la micropropagación de gloxinia y se evaluó en cinco fenotipos. Se realizó un estudio histológico al microscopio electrónico de barrido para determinar el origen de los brotes producidos, utilizándose secciones adaxiales de hoja cultivadas *in vitro*. Se observó que la respuesta organogénica fue superior cuando se utilizaron segmentos de hoja como explante inicial (67%), respecto a la inoculación *in vitro* de segmentos de pedúnculo floral (20%). Se determinó el efecto de la combinación de citocininas y auxinas en el medio de cultivo sobre el porcentaje de brotación de los diferentes materiales de gloxinia. Se observó una respuesta diferencial según el fenotipo cultivado. El estudio histológico mostró la secuencia de eventos morfogénicos que conducen a la regeneración *de novo*. Los cambios observados en las células adyacentes a los tricomas glandulares sugieren que éstas actúan como células blanco, en forma similar a lo reportado en otras ornamentales como begonia y violetas.

## Palabras clave

gloxinia, micropropagación, organogénesis, histología.

## Introducción

La gloxinia, de la familia Gesneriaceae, comprende más de 125 géneros y más de 2000 especies. Fue llamada *Gloxinia speciosa* y actualmente se conoce como *Sinningia speciosa*, aunque es mejor conocida por su nombre común. Para los floricultores, las gloxinias, junto con las violetas africanas, son los miembros comercialmente más importantes de esta familia. La gran aceptación y la alta demanda por gloxinias en el mercado ha llevado a la producción de gran cantidad de híbridos y a pesar de que la propagación de esta planta se ha realizado por semilla o por tubérculo, la necesidad de mantener líneas homogéneas y producir altos volúmenes ha impulsado la búsqueda y desarrollo de métodos más eficientes para reproducirlas (Claraso, 1974; Kimmins, 1988).

<sup>1</sup> Centro de Investigación en Biotecnología (CIB). Escuela de Biología. Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica. Apdo. 159-7050. Fax: (506) 551-5348. Internet: salvarenga@itcr.ac.cr y aabdelnour@itcr.ac.cr

Las técnicas del cultivo de tejidos o cultivo *in vitro* se presentan como una opción eficiente para la multiplicación clonal rápida de esta especie. En general, el cultivo de tejidos consiste en cultivar bajo condiciones asépticas fracciones de un tejido u órgano, células y protoplastos (explante), bajo condiciones físicas y químicas adecuadas que permiten la regeneración de plantas. La técnica de micropropagación consiste en la multiplicación clonal masiva *in vitro* y presenta importantes ventajas en comparación con los sistemas convencionales de propagación vegetativa. Permite el incremento acelerado del número de plantas derivadas por genotipo, reducción del tiempo de multiplicación, la posibilidad de multiplicar grandes cantidades de plantas en una superficie reducida, a bajos costos y en tiempos económicamente rentables. Además, permite controlar la sanidad del material que se propaga y facilita el transporte de materiales *in vitro* de un país a otro (Ashmore, 1997).

En esta especie no se han reportado estudios organogénicos que puedan esclarecer el origen de los brotes.

El objetivo del presente trabajo fue establecer el protocolo de cultivo *in vitro* de esta especie y tratar de esclarecer el proceso de morfogénesis que conduce a la formación de brotes.

## Materiales y métodos

### Micropropagación de gloxinia

#### *Establecimiento in vitro*

Como material inicial para la experimentación en micropropagación se utilizaron segmentos de pedúnculo floral y segmentos de hoja de plantas adultas mantenidas en invernadero. Para las pruebas de desinfección de los explantes, tanto de pedúnculos florales

como de hojas, se utilizó una secuencia de lavado con agua y detergente, seguida por la incubación de los materiales en uno de los siguientes productos: Hipoclorito de Sodio ( $\text{NaOCl}_2$ ) (producto comercial con 3,5% i.a.); Hipoclorito de Calcio  $\text{Ca}(\text{OCl}_2)_2$  (producto comercial con 67% de i.a.) y Kilol® (producto comercial al 11% i.a.), en las concentraciones indicadas en el Cuadro 1. En todos los casos el proceso de desinfección se realizó empleando una bomba de vacío. En la cámara de transferencia de flujo laminar, bajo condiciones asépticas, los explantes se enjuagaron 3 veces con agua destilada estéril para eliminar los restos de desinfectante. Una vez desinfectados, los pedúnculos florales y hojas se dividieron en segmentos de aproximadamente 1 a 1,5 cm de las secciones de lámina y vena central. Se inocularon en el medio de cultivo para la inducción de brotes. Para todas las pruebas se utilizó el medio básico descrito por Murashige y Skoog (MS) (1962), enriquecido con las vitaminas de Morel (1958). Se agregó Benciladenina (BA) y Ácido Naftalencacético (ANA) según se describe más adelante en los resultados (Cuadro 3).

#### *Inducción de organogénesis*

Una vez establecidos los materiales bajo condiciones asépticas se procedió a evaluar la inducción de organogénesis. Inicialmente se evaluó la respuesta del tipo de explante, pedúnculo floral y hoja. Para esta prueba se utilizó el medio de cultivo básico MS con 1 mg/l de BA y 0,2 mg/l de ANA, según lo recomendado por Bigot (1974) para la micropropagación de gloxinia a partir de pedúnculos florales.

También se evaluó el efecto de los reguladores de crecimiento en la inducción de brotes en cinco fenotipos de gloxinia (plantas con flores de color lila con blanco, roja, morada, fucsia,

morada con blanca). Los tratamientos consistieron en la adición de 1 mg/L de BA + 0,2 mg/L de ANA y 5 mg/L de BA + 2 mg/L de ANA. Para estas pruebas se utilizaron trozos de hoja como material inicial, debido a su mayor respuesta organogénica y disponibilidad durante todo el año.

Para determinar el número promedio de plantas regeneradas por explante cultivado *in vitro*, se utilizaron segmentos de hoja de 10 mm<sup>2</sup>, hojas enteras de 10 mm de longitud, vitroplantas con cuatro hojas y callos del fenotipo de flores fucsia. Éstos fueron subcultivados en los medios de inducción que contenían 1 mg/L BA + 0,2 mg/L ANA y 5 mg/L BA + 2 mg/L ANA (Cuadro 4).

Para la aclimatación, las vitroplantas, aún en los envases de cultivo, fueron mantenidas en el invernadero por una semana; luego se procedió a sembrarlas en macetas.

### Estudio histológico

El estudio histológico se realizó en la Unidad de Microscopía Electrónica de la Universidad de Costa Rica. Las muestras procesadas consistieron de las secciones de hojas de gloxinia de flor fucsia que se cultivaron *in vitro* en el medio de cultivo MS con 5 mgL<sup>-1</sup> de BA y 2 mgL<sup>-1</sup> de ANA. Se tomaron cada dos días durante cuarenta y cinco días. Las muestras se fijaron por 24 horas a 4°C en una solución de glutaraldehído al 2,5% y paraformaldehído al 2% en amortiguador de fosfato de sodio 0,1M pH 7,4 (Karnovsky, 1965); luego se sometieron a tres lavados de 10 minutos con el amortiguador antes mencionado. Se postfijaron por dos horas con tetraóxido de osmio al 1% en el amortiguador de fosfatos. Se realizaron cinco lavados con el amortiguador y se deshidrataron en un gradiente ascendente de alcohol etílico (30°, 50°, 70°, 80°, 90°, 95° y 100°); los cambios en los alcoholes de 30 a 95° se

hicieron por un período de 15 minutos, y los de 100° por 20 minutos cada uno. Se efectuaron 4 cambios con alcohol terbutílico, cada uno de 20 minutos; luego se secaron por sublimación (Sublimador Eiko ID-2). Después del secado, las muestras se montaron con cinta adhesiva de doble cara, sobre bases de aluminio y luego se cubrieron con 30 mm de oro-paladio, utilizando un cobertor iónico (modelo Eiko IB-3). Se observaron en un microscopio electrónico de barrido (modelo Hitachi S-2360N y S-570SEM 570), con un voltaje de aceleración de 15Kv a una distancia de trabajo entre 15 y 30 mm. Se tomaron fotografías con película Kodak Verichrome Pan ASA 100, a aumentos comprendidos entre 35 y 2500x.

## Resultados y discusión

### Micropropagación de gloxinia

#### *Establecimiento in vitro*

Tanto el hipoclorito de sodio como el hipoclorito de calcio, en las concentraciones utilizadas durante esta experiencia fueron efectivos para lograr el establecimiento *in vitro* de los explantes de gloxinia (18% al 78% de explantes establecidos asépticamente) (Cuadro 1). En general, se obtuvieron mayores porcentajes de segmentos de pedúnculos florales establecidos asépticamente (38% al 78%) que de explantes de segmentos de hoja (18% al 40%). Probablemente la menor pubescencia que presentan los pedúnculos florales comparados con las hojas, permitió un mayor contacto entre los desinfectantes y la superficie del explante. Para pedúnculos florales, el tratamiento que consistió de dos desinfecciones consecutivas con hipoclorito de sodio (NaOCl<sub>2</sub>) al 50% y al 30% durante 4 y 6 minutos respectivamente, permitió el menor porcentaje de explantes contaminados

**Cuadro 1**  
**Efecto de los tratamientos de desinfección sobre los explantes de gloxinia introducidos al cultivo aséptico.**

Tratamiento *	Contaminación (%)		Explantes muertos (%)		Explantes establecidos asépticamente (%)	
	Pedúnculo floral	Hoja	Pedúnculo floral	Hoja	Pedúnculo floral	Hoja
NaOCl <sub>2</sub> al 50% y 30% por 4 y 6 minutos, respectivamente	8	63	14	19	78	18
1g/L de Benlate por 45 minutos Ca(OCl <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> al 50% y 30% por 4 y 6 minutos, respectivamente	20	52	31	47	49	1
NaOCl <sub>2</sub> al 60% por 4 minutos y al 40% por 4 minutos	7	18	55	42	38	40
Kilol al 100% por 45 minutos	100	100	-	-	0	0

\*La concentración de los desinfectantes se indica como porcentaje de producto comercial. Hipoclorito de sodio 3,5% i.a., hipoclorito de calcio 67% i.a. y Kilol 11% i.a.

(8%), muertos (14%) y la mayor sobrevivencia (78%). Sin embargo, cuando este producto se utilizó también en incubaciones consecutivas pero a mayores concentraciones (60% y 40%), el porcentaje de pedúnculos establecidos asépticamente disminuyó al 38% y se incrementó el porcentaje de explantes muertos (55%). Por otra parte, cuando este tipo de explante se incubó en Benlate seguido por dos desinfecciones consecutivas con Ca(OCl<sub>2</sub>)<sub>2</sub>, el porcentaje de contaminación y mortalidad se incrementó al 20% y 31% respectivamente, comparado con el mejor tratamiento con NaOCl<sub>2</sub>, y el 49% de los explantes tratados pudo ser establecido asépticamente.

Contrariamente a los resultados obtenidos con la desinfección de pedúnculos florales, cuando la desinfección de las hojas se efectuó con el tratamiento que presentaba las mayores concentraciones de NaOCl<sub>2</sub>, se observó el mayor porcentaje de explantes establecidos asépticamente (40%). De acuerdo con los resultados obtenidos durante esta investigación, el tratamiento de desinfección más efectivo para segmentos de hojas fue el empleo de hipoclorito de sodio al 60% y 40% (v/v) consecutivamente, por 4 minutos en la bomba de vacío.

Es importante destacar que, a pesar de que las hojas de gloxinia requieren una desinfección más drástica que los de pedúnculos florales, y que el porcentaje de explantes establecidos asépticamente

es menor (40%) respecto a los explantes de pedúnculo (78%), las hojas son materiales disponibles durante todo el año, por lo que la disponibilidad de

material inicial no sería nunca una limitante para iniciar el proceso de micropropagación.

Por otra parte, el Kilo1® no resultó un desinfectante apropiado para la desinfección de estos materiales, ya que se observó 100% de contaminación en los dos tipos de explantes evaluados. Este producto es recomendado para la desinfección de semillas en invernadero, pero durante el establecimiento *in vitro* de materiales vegetales, donde la asepsia es necesaria, el Kilo1® no parece ser efectivo.

### Inducción de organogénesis

Cuando se evaluó la respuesta del tipo de explante (pedúnculo floral y hoja) a la organogénesis, los resultados obtenidos mostraron una mayor respuesta organogénica de los segmentos de hoja (lámina más vena central) (67%) que de los pedúnculos florales (20%) (Cuadro 2). Esto podría explicarse con base en la mayor superficie de contacto y área de la hoja con respecto al pedúnculo floral.

Cuando se evaluó el efecto de los reguladores de crecimiento sobre la brotación de los explantes (Cuadro 3), se observaron diferencias en la respuesta según el fenotipo. La adición de 1 mg/L de BA y 0,2 mg/L de ANA indujo una alta formación de brotes que varió del 38% al 71% en los diferentes materiales de gloxinia evaluados; los fenotipos de flor lila con blanco y morada mostraron el mayor porcentaje de brotación (67% y 71% respectivamente). Por otra parte, los explantes inoculados en el medio de cultivo con 5 mg/L de BA + 2 mg/L de ANA mostraron porcentajes de brotación que variaron de nula para el fenotipo lila con blanco a 78% para el morado con blanco. Excepto los fenotipos con flor lila con blanco y roja, el tratamiento con las concentraciones mayores de reguladores de crecimiento indujeron mayor porcentaje de explantes brotados.

**Cuadro 2**  
**Respuesta del tipo de explante a la inducción de organogénesis.**

Explante	Respuesta organogénica (%)
Pedúnculo floral	20
Hoja	67

**Cuadro 3**  
**Efecto de los reguladores del crecimiento sobre la inducción de brotes a partir de trozos de hoja en cinco fenotipos de gloxinia.**

Tratamiento (mg/L)	Brotación %				
	Lila +Blanco	Roja	Morada	Fucsia	Morada +Blanco
1,0 BA + 0,2 ANA	67	50	71	38	39
5,0 BA + 2,0 ANA	0	11	75	53	78

**Cuadro 4**  
**Regeneración de gloxinia del fenotipo de flor fucsia a partir de varios tipos de explantes.**

Tipo de explante	Plantas regeneradas (Promedio)	
	1 mg/L BA+0,2 mg/L ANA	5 mg/L BA+2 mg/L ANA
Segmento de hoja (10 mm <sup>2</sup> )	3	73
Hojas enteras (10 mm de longitud)	12	86
Vitroplanta (con 4 hojas)	30	102
Callo	-	52

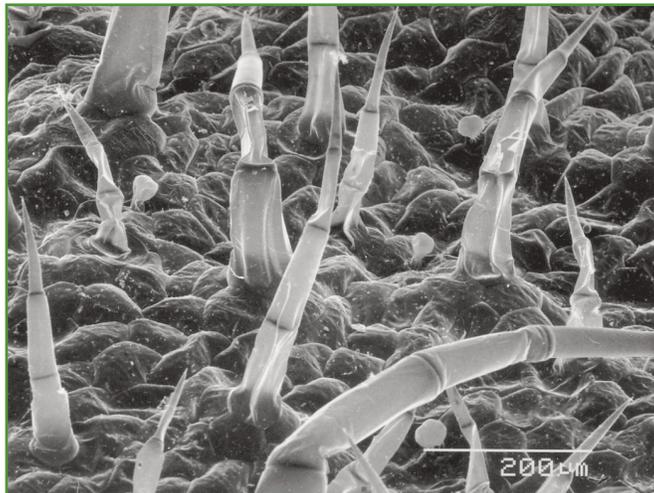
Por otra parte, los diferentes tipos de explantes mostraron regeneración de plantas al ser subcultivados; las vitroplantas enteras con cuatro hojas mostraron el mayor número de nuevas plantas (30 y 102 en los medios con menor y mayor concentración de reguladores de crecimiento

respectivamente). Cabe resaltar que el subcultivo en el medio con mayor concentración de reguladores de crecimiento (5 mg/L de BA + 2 mg/L de ANA) indujo la regeneración de un número considerablemente mayor de plantas por explante. A partir de los callos producidos durante la fase de establecimiento y brotación, se regeneraron plantas.

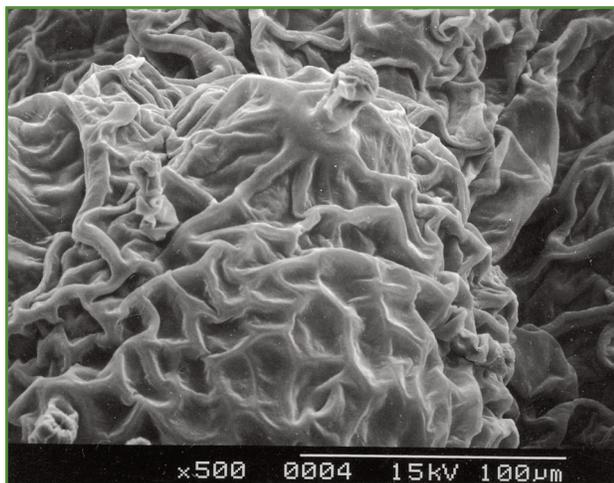
Para el desarrollo de las vitroplantas, los brotes se transfirieron al medio de cultivo sin reguladores de crecimiento, mostrando un buen desarrollo y permanecieron individualizadas sin que se produjera una brotación secundaria. Después de cuatro semanas fueron transferidas al invernadero donde se aclimataron.

### Organogénesis *in vitro*

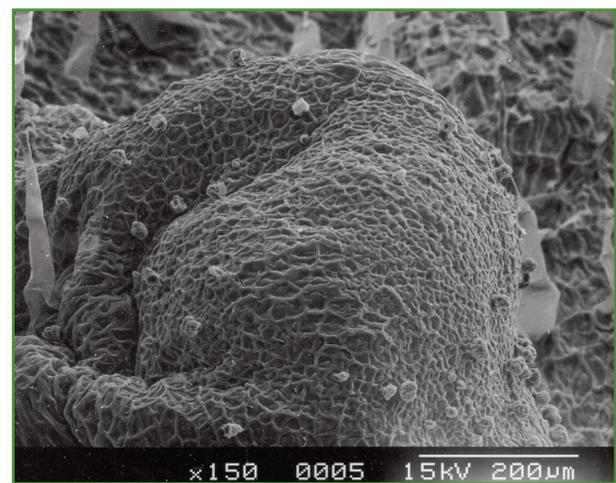
El estudio histológico realizado con el empleo del microscopio electrónico de barrido mostró, en primera instancia, que la epidermis adaxial de una hoja de gloxinia antes de la inoculación *in vitro* presentaba una distribución uniforme de las células epidérmicas con tricomas



**Figura 1**  
Superficie adaxial de hoja de *Gloxinia*, previo al cultivo *in vitro*.



**Figura 2**  
Explante de hoja de gloxinia a los 20 días de cultivo en el medio con 5 mg/L de BA + 2 mg/L de ANA, con intensa división de células adyacentes al tricoma glandular.



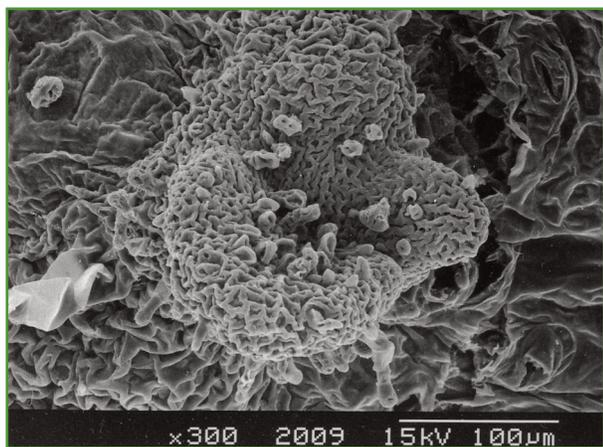
**Figura 3**  
Domo meristemática formado a las 5 semanas del cultivo *in vitro* de explantes de hoja; se observan los primeros indicios de los primordios foliares.

pluricelulares (TP) y tricomas glandulares (TG) (Fig. 1). Después de veinte días, los explantes de hoja inoculados en el medio de cultivo con 5 mg/L de BA + 2 mg/L de ANA presentaron una intensa división de las células epidérmicas adyacentes al tricoma glandular (Fig. 2), lo que hace suponer que los estadios iniciales de organogénesis se presentan a los pocos días de cultivo. A las cinco semanas de cultivo se observó el domo meristemático y los primeros indicios de los primordios foliares (Fig. 3). Ya a los cuarenta días de cultivo, se distinguían los brotes con los primordios foliares desarrollados (Fig. 4) y a las siete semanas se observó la regeneración de vitroplantas (Fig. 5). En las figuras se observan los diferentes estadios de la regeneración en explantes de hoja y a partir de vitroplantas.

Aunque no hay reportes previos de organogénesis *in vitro* en gloxinia, en otras especies de ornamentales que se cultivan por segmentos de hoja, como *Saintpaulia ionantha* Wendl. (violeta

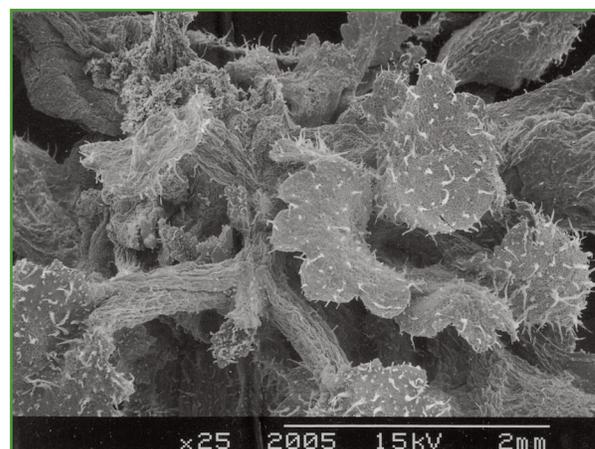
africana) y *Begonia rex* (begonia) se ha informado sobre una intensa activación de las células epidérmicas cercanas a los tricomas glandulares para la diferenciación de brotes o tallos (Ohki, 1994; Bigot, 1970). La diferencia en la capacidad organogénica de los diferentes tejidos, y específicamente de las células epidérmicas, es desconocida; podría deberse, como lo sugiere Bigot (1976) a una aptitud metabólica diferencial de estos tejidos, considerándose como células blanco para la diferenciación.

Resultados similares se obtuvieron en el presente trabajo, ya que el estudio realizado con microscopía electrónica de barrido, mostró cambios morfogénéticos evidentes en las células adyacentes a los tricomas glandulares, por lo que se podría considerar que estas células epidérmicas actúan como células blanco en el desarrollo de los eventos que conducen a la formación *de novo* y la consecuente regeneración *in vitro* de las plantas de gloxinia.



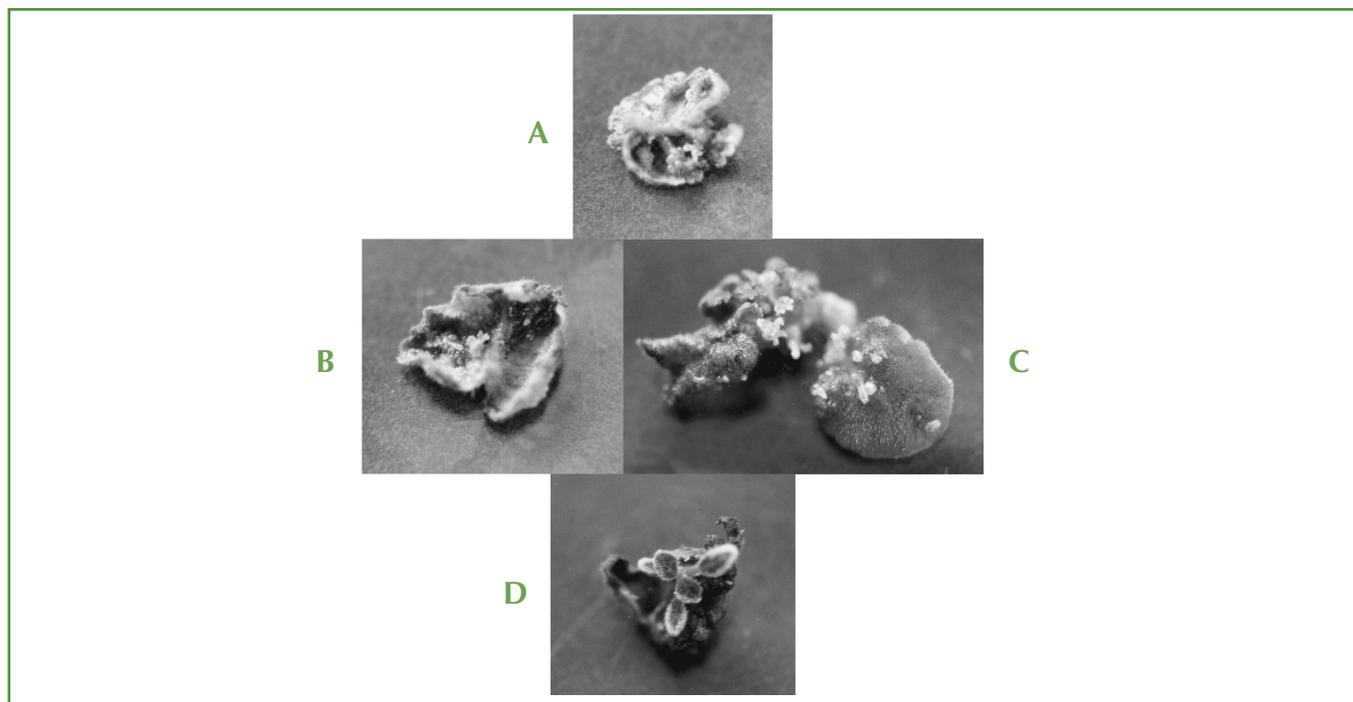
**Figura 4**

Explante de hoja de gloxinia a los 40 días de cultivo en el medio con 5mg/L de BA y 2mg/L de ANA; nótese los nuevos meristemas con los primordios foliares formados.



**Figura 5**

Vitroplanta regenerada a partir de un segmento de hoja a las 7 semanas del cultivo *in vitro*; se observan los primordios foliares.



**Figura 6**

Diferentes estadios de regeneración en explantes de hoja y de vitroplantas de *Gloxinia*. A). Se observa la formación de numerosos brotes a partir de un fragmento de hoja inoculado en un medio con baja proporción de reguladores del crecimiento. B). Nótese la neoformación de una plántula, a las 7 semanas de cultivo en el medio A. C). Se observa la presencia de gran cantidad de brotes y plantas regeneradas en la superficie adaxial de las hojas de una vitroplanta con 4 hojas. D). Planta regenerada a partir de un fragmento de hoja de 10 mm de longitud, a las 8 semanas de cultivo.

### Literatura citada

- Ashmore, S. 1997. Status report on the development and application of *in vitro* techniques for the conservation and use of plant genetic resources. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. 67 p.
- Bigot, C. 1970. Position privilégiée des noyaux des cellules épidermiques donnant naissance aux bourgeons épiphylls d'un clone de *Begonia rex* Putz. Observation sur les protéines basiques au niveau de l'épiderme. C. R. Acad. Sci. 271(D):126-1529.
- Bigot, C. 1976. Bourgeonnement *in vitro* à partir d'épiderme séparé de feuille de *Bryophyllum draigumontianum* (Crassulacées). Canadian Journal of Botany. 54: 852-857.
- Bigot, C. 1970. Position privilégiée des noyaux des cellules épidermiques donnant naissance aux bourgeons épiphylls d'un clone de *Begonia rex* Putz. Observation sur les protéines basiques au niveau de l'épiderme. C.R. Acad. Sci. 271(D): 1526-1529.
- Claraso, N. 1974. Multiplicación de las plantas de jardín. 5 ed. Editorial Gustavo Gili. Barcelona. 269 p.
- Kimmins, R.K. 1988. Gloxinias, violetas africanas y otras gesneriáceas. En: Introducción a la floricultura. Larson, R.A. (ed.) A.G.T. Editor S.A. México. pp. 259-270.
- Okhi, S. 1994. Scanning electron microscopy of shoot differentiation *in vitro* from leaf explants of the of the Africans violet. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 36:157-162.
- Villalobos, V. M.; Thorpe, T. A. 1991. Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. In: Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Roca, W.M. y Mroginski, L.A. (eds.). CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). Cali, Colombia. pp.127-130.