

## PONIENDO EN CLARO

### Producción de nuevas variedades de *Saintpaulia ionantha* mediante variación somaclonal

Julián Ignacio Mendoza Fernández<sup>1</sup>, Miguel Ángel Muñoz Serrano<sup>2</sup>, Iván Parra Izquierdo<sup>3</sup>, Sergio Villazala Merino<sup>4</sup>

Facultad de C. C. Biológicas y Ambientales. Universidad de León. Alumnos de 3º curso de grado en Biotecnología (curso 2011-2012)

<sup>1</sup>(imendjoo@estudiantes.unileon.es), <sup>2</sup>(mmunos01@estudiantes.unileon.es),  
<sup>3</sup>(iparrio0@estudiantes.unileon.es), <sup>4</sup>(svillmo0@estudiantes.unileon.es)

En este artículo se presenta un proyecto que describe el proceso productivo completo para generar y comercializar nuevas variedades de violeta africana (*Saintpaulia ionantha*), sin utilizar transgénesis. Para ello, se utilizan distintas técnicas biotecnológicas, basadas generalmente en el cultivo *in vitro*. No obstante, existen otros métodos con los que se podría estudiar la obtención de nuevas variantes somaclonales, como son cultivo de haploides, fusión de protoplastos y utilización de agentes mutágenos. El método más usado en esta especie es el cultivo de callos en medio MS suplementado con benziladenina (BA) 0,5  $\mu\text{M}$ , bajo una intensidad de luz de 35  $\mu\text{moles} / \text{m}^2 \text{s}$  y una temperatura de 25°C. Algunas de las variantes obtenidas podrían tener interés comercial. Sobre estas plantas se hace necesario testar si el cambio producido en la variante existe a nivel genético o epigenético (en este último caso no nos interesa) mediante el uso de marcadores moleculares como RFLP. Si el cambio se ha producido sobre la secuencia de ADN, se necesitará comprobar su adaptación a condiciones de campo y estabilizar su genotipo mediante sucesivas rondas de micropropagación por vía directa. Posteriormente se micropropagará masivamente y se elaborará un banco de germoplasma, con un estricto control fitosanitario, para poder satisfacer la demanda del mercado.

**Palabras clave:** Micropropagación, violeta africana, marcadores, variación somaclonal, cultivo *in vitro*

#### Introducción

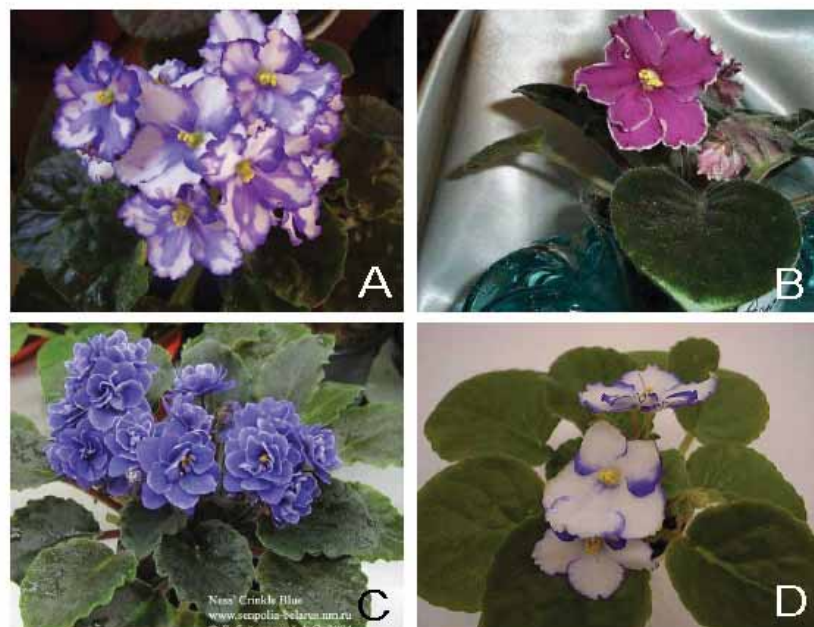
La *Saintpaulia* o “violeta africana” es una de las plantas ornamentales más usadas y populares para interiores, principalmente por su capacidad para producir, casi en cualquier época del año, abundantes y coloridas flores. Es originaria de las zonas tropicales del África central. Posee carnosas hojas de color verde intenso y delicadas flores violáceas, bastante atractivas para la decoración. La especie más utilizada es en concreto la *Saintpaulia ionantha*.

Perteneciente a la familia de las Gesneriáceas (un género que comprende una docena de especies perennifolias), su tamaño no suele superar los 15 cm y se reproduce por semillas o por esquejes. De su tallo, poco perceptible, parten los pecíolos que portan hojas redondeadas y carnosas de color verde oscuro. Lo habitual es que sus flores aparezcan en verano, pero pueden tener más de una floración al año, que puede producirse en cualquier temporada. Entre cada floración hay un ciclo de descanso de unas seis semanas como mínimo.

Normalmente sus flores brotan en grupos de 6. El color más común es el violeta con estambres amarillos en el centro, aunque también hay blancas, rosas, rojas, azules e incluso de varios colores.

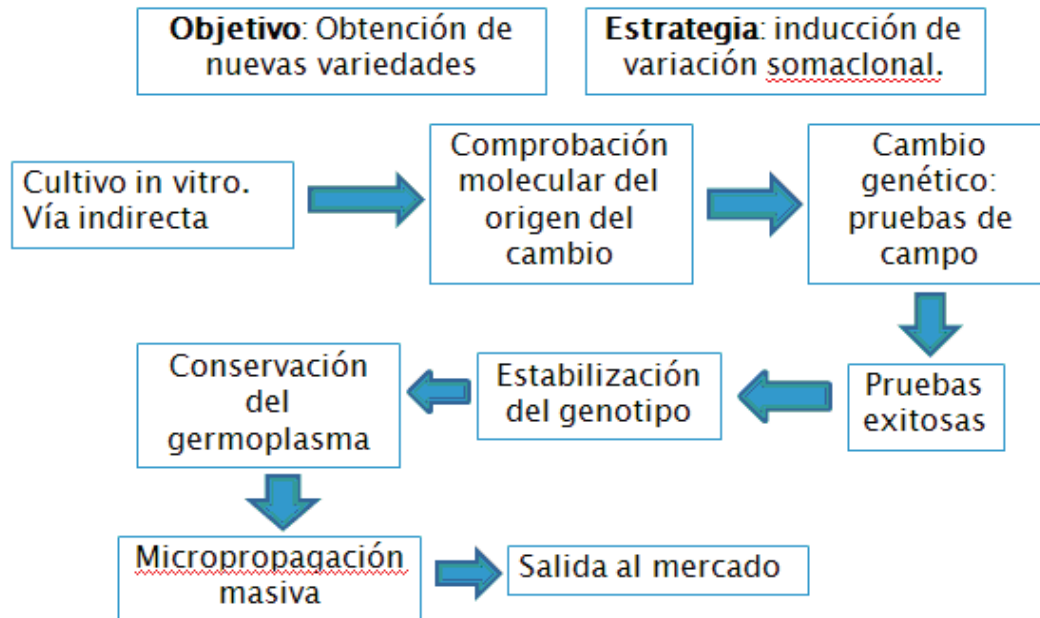
La temperatura de mantenimiento no debe bajar de los 18°C y requiere un riego constante en verano y muy moderado en invierno; pero siempre con agua templada. Es recomendable usar para su cultivo un sustrato no calcáreo a base de turba. Las flores son sensibles a algunos patógenos como el pulgón verde y algunas cochinillas y ácaros.

Las variedades que se encuentran actualmente en el mercado realmente ya guardan poco parecido con las que crecen de manera natural en la zona de Tanzania. Podemos ver algunos ejemplos en la **Fig. 1**.



**Figura 1.** Imágenes de distintas variedades de violeta africana obtenidas mediante el uso de técnicas de transgénesis y variación somaclonal. A: Alwyn; B: Frosted Midnight; C: Ness' Crinkle Blue; D: chiko. Fuente: [www.infojardin.com](http://www.infojardin.com).

Nuestro proyecto consta de varios pasos que pueden resumirse en el esquema de la **Fig. 2**.



**Figura 2.** Esquema de los pasos de los que consta el proceso de obtención y cultivo de variedades de violeta africana.

En las instalaciones del vivero se dispone de todo el material necesario para aplicar cualquier estrategia biotecnológica destinada a la consecución de nuestro objetivo.

### Variación somaclonal

La variación somaclonal se define como la variación genética o epigenética que se genera durante el cultivo in vitro de plantas que provengan de células somáticas. En programas de mejoramiento genético, puede ser un recurso importante que genera variabilidad y permite obtener características deseables.

Además de la tasa normal de variación, hay factores externos, propios del cultivo in vitro, que pueden inducir una acumulación de variaciones genéticas y epigenéticas, que se manifiestan en el fenotipo:

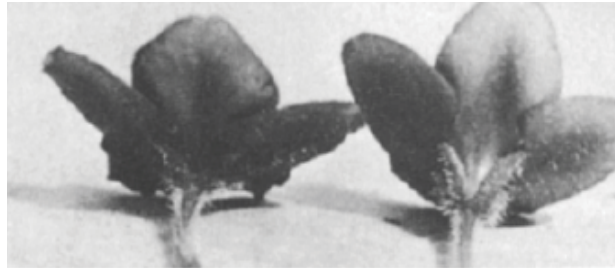
- Método de cultivo in vitro
- Edad del cultivo y subcultivos (aumenta con la edad del cultivo).
- La composición del medio de cultivo y el estado físico del medio de cultivo (líquido o sólido).

Para inducir variación somaclonal en nuestro proyecto valoramos dos

posibilidades: la primera consiste en el cultivo de explantos por vía indirecta, usando pétalos o meristemos, ya que muchos autores han comprobado que se genera una mayor variación. La otra posibilidad es proponer nuevas técnicas para obtener variantes, que no hayan sido descritas para *Saintpaulia ionantha*.

#### Cultivos definidos para inducir variación somaclonal en *Saintpaulia ionantha*

La obtención de callo permite obtener una mayor cantidad de ejemplares con variaciones (vía indirecta). El método estándar para generar callos en *Saintpaulia*, consiste en el cultivo de explantos en medio MS con BA 0,5  $\mu\text{M}$ . Posteriormente estos explantos son subcultivados en el mismo medio en intervalos de 4-5 semanas. Algunos factores importantes a regular son la intensidad de luz, que debe estar en torno a 35  $\mu\text{moles} / \text{m}^2 \text{s}$ , y temperatura (25  $^{\circ}\text{C}$ ) (Jain, 1992).



**Figura 3.** Ejemplo de la variación de la morfología de la flor en violeta africana tras aplicar variación somaclonal. Fuente: Jain, 1992.

Después se enraízan las plantas con medio MS suplementado con ácido naftalenacético (NAA) 0,6  $\mu\text{M}$ , bajo una intensidad de luz de 4  $\mu\text{moles} / \text{m}^2 \text{s}$  y un fotoperiodo de 16 horas.

Los explantos regenerados se transfieren a bandejas de plástico y se mantienen con 100% de humedad en invernadero, disminuyendo luego la humedad al 70% (Jain, 1992). En este punto es en el que se detectan las variaciones somaclonales, y se seleccionan las más interesantes.

Utilizando explantos de pétalos y meristemos en estas condiciones se obtienen, sobretodo, diferencias en la morfología de la planta y de la flor, en el número de flores por planta, el tamaño de la flor, la altura de la planta y el tiempo de floración (Jain, 1992). Se podría probar el uso de otros explantos y observar la tasa de variación obtenida.

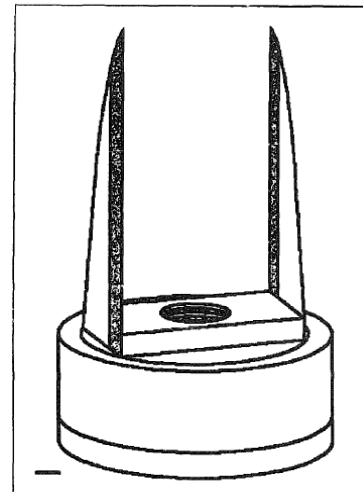
La presencia de BA en el medio de cultivo induce variación somaclonal, que también aumenta con el número de subcultivos antes de la regeneración. Pero un exceso en la concentración de BA o en los pases de subcultivo disminuye la estabilidad y calidad de las plantas.

Para obtener un mayor número de plantas y aumentar la probabilidad de encontrar variantes de interés se utilizará un homogenizador (Molgaard, 1991), que tiene la función de disgregar los callos, incrementando así el potencial de

micropropagación, al poder obtener una suspensión celular. El homogenizador (**Fig. 4**) se introduce acoplado a un motor en el frasco donde esté el callo en suspensión. Gracias al movimiento giratorio, las cuchillas que posee disgregan el callo.

#### Cultivo optimizado para obtener variaciones en el color de la flor

Recientemente se ha descrito que las variaciones en el color de las flores son debidas a la escisión de un transposón que se integra en la región promotora de la flavonoida 3', 5'- hidroxilasa, (enzima que se relaciona con la coloración de la flor). Para la modificación del color con este tipo de transposón, algunos autores definieron un nuevo medio de cultivo que favorece una mayor tasa de variación en cuanto al color de la flor: utilizaron unas condiciones de cultivo con una intensidad de luz de 140-200  $\mu\text{moles} / \text{m}^2\text{s}$  y una temperatura de 10-35°C, en medio MS con 1 ppm de NAA y 1 ppm de BA, con un 3% de sacarosa y un 0,3 % de gelatina. El pH fue aproximadamente de 5,8 -6,0. (Sato, 2011). Se utilizará este medio optimizado para el cambio de color de las flores.



**Figura 4.** Homogenizador utilizado para disgregar callos. Fuente: Molgaard, 1991.

#### Otras técnicas

Existe la posibilidad de experimentar con otras técnicas que hasta ahora no han dado buenos resultados o no se han descrito en violeta africana.

#### Cultivo de haploides

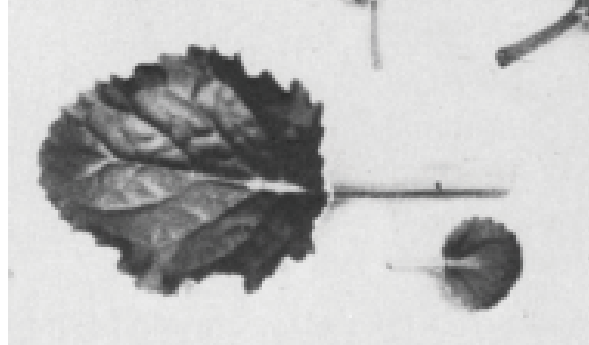
El color de la flor de la violeta africana depende de 8 genes (I, S, W, Bd, Bw, P, R, A). Según la combinación génica se obtendrán flores de un color o de otro:

- I y S: inhiben la pigmentación si tienen un alelo dominante.
- W es necesario para la pigmentación y solo requiere un alelo dominante para que se exprese color.
- Bd, Bw y A influyen en la intensidad del color. Para una coloración de flor lila el genotipo sería, “ii-ss-W-P-R”; el genotipo “ii-ss-W-pp-R” codifica para flores de color rosa y si el genotipo es “ii-ss-W-P-rr” serán rojas.
- Un alelo inestable en el locus P da lugar a flores rosas con puntos lilas, a este tipo de fenotipo se le llamara fantasía (Griesbach, 1997). Podría resultar interesante la generación de haploides para conseguir una nueva coloración. Podría plantearse la obtención de diplohaploides.

Los haploides suelen presentar un tamaño reducido (**Fig. 5**), y por tanto esta estrategia puede ser ornamentalmente interesante; pero se obtiene muy poca cantidad de planta y no son muy vigorosas. Se podría llegar a utilizar esta técnica para obtener plantas en miniatura de la variedad deseada (1/3 del tamaño normal) (Smith et al., 1980).

#### *Cultivo de protoplastos*

Existen métodos para obtener planta, pero las plantas obtenidas no presentan variación somaclonal significativa con respecto al color y a la forma de la hoja. Se sabe que para obtener variación somaclonal los explantos más utilizados son los pétalos o los meristemos, por tanto se



**Figura 5.** Imagen en la que se puede apreciar la diferencia de tamaño entre una hoja normal y una hoja obtenida por cultivo de haploides Fuente: Smith, 1980.

podrían realizar estudios para ver si con el cultivo de protoplastos a partir de estos explantos y variando las concentraciones de BA y NAA, se pueden obtener variantes somaclonales de interés (color de la flor, forma de la hoja, etc.) (Hoshino et al., 1994; Winkelmann y Grunewalt, 1995).

#### *Agentes mutágenos*

La cafeína o la colchicina son agentes que adicionados al cultivo *in vitro* producen variantes somaclonales.

- La colchicina genera aneuploidías y poliploidías en prácticamente todas las especies vegetales. La colchicina es un agente fusógeno, se une a los microtúbulos del huso mitótico impidiendo que se separen los cromosomas durante la mitosis. Las plantas que se obtendrían serían poliploides y estas suelen presentar una coloración de la flor oscura (Espino, 1979).
- La cafeína, que es un alcaloide, también funciona como agente mutágeno generando gran cantidad de plantas quimeras, pero no aneuploidías ni poliploidías (Espino y Vázquez, 1979).

Existen otros tratamientos con agentes mutágenos con los cuales se podrían realizar experimentos para obtener variantes de interés (Bairu et al., 2010). Se usarán métodos químicos y físicos (Rayos X y Gamma). Respecto a los rayos X, con un primer tratamiento más suave se genera resistencia, que servirá de protección para un tratamiento posterior más intenso. Produce muerte celu-

lar al igual que los rayos gamma.

A continuación se muestra una tabla con diferentes agentes químicos que pueden generar mutaciones, y por tanto, constituyen una posible vía de obtención de variación somaclonal.

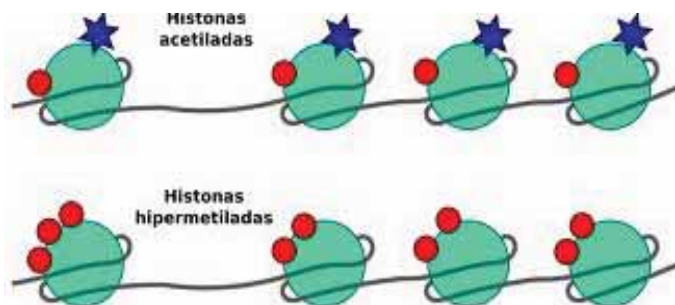
**Tabla 1.** Resumen de los distintos agentes mutágenos químicos que podrían ser usados en el estudio

Agentes mutagenizantes	
Efecto auxínico	2,4-D (ácido 2,4-diclorofenilacético); NAA (ácido naftalenacético); IAA (ácido indolacético); 2,4,5-T (ácido 2,4,5 triclorofenoxiacético)
Efecto citoquinínico	BA (benciladenina); Kinetina; 2,3 MDPU (N,N'-bis-2,3-metilenodioxifenilurea); 4- CPPU N-(2-Cloro-4-piridil-N-fenilurea); TDZ (tidiazuron)
Efecto giberélnico	Ácido giberélico
Agentes físicos	Rayos X; Rayos Gamma
Otros compuestos químicos	Azacitidina; Nitrosometilurea; Etil-metilsulfonato; Trifluralina; Azida sódica.

No todos estos agentes se han usado para obtener variantes en violeta africana, pero sí en otras especies vegetales. Se pueden utilizar para realizar pruebas y cultivar explantos en medios de cultivo con estos compuestos, obteniendo variantes de interés.

### Marcadores moleculares

Como ya se ha indicado, se conoce la mayor parte de los genes que codifican para el tamaño, forma y color de las flores. Se pueden obtener las secuencias de estos genes en los progenitores y en las nuevas variedades obtenidas y comprobar su grado de coincidencia (si son iguales el cambio será epigenético, y no interesa, **Fig. 6**). Con los marcadores moleculares podremos detectar la presencia o no de esas variaciones de forma rápida. Normalmente se admite que la variación no es epigenética cuando tras el paso de 4 generaciones no se ha perdido esa variación, pero nuestros intereses hacen más recomendable



**Figura 6.** Los cambios epigenéticos pueden ser debidos a acetilaciones y metilaciones en las histonas. Fuente: <http://quimicosonador.wordpress.com>.

el uso de otras técnicas que nos permitan saberlo rápidamente.

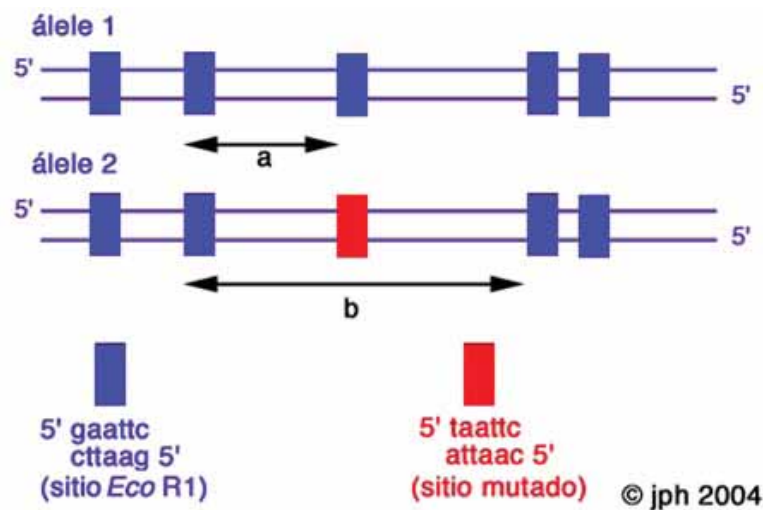
Los marcadores del ADN se basan fundamentalmente en el análisis de las diferencias en pequeñas secuencias del ADN entre individuos. Las técnicas empleadas para ello son muy diversas y dan el nombre a los distintos tipos de marcadores, los cuales pueden ser de carácter dominante o codominante. Ejemplos de marcadores utilizados normalmente en plantas (explicaremos los más usados para nuestro objetivo) son:

- Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP).
- Amplificación aleatoria del ADN polimórfico (RAPD).
- Polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP).
- Microsatélites o Secuencias simples repetidas (SSR).

### RFLP

Es un marcador basado en la hibridación de ADN.

Los RFLPs (**Fig. 7**) son polimorfismos entre individuos dados por el tamaño de los fragmentos que son cortados por enzimas de restricción. Los fragmentos de ADN son separados según su movilidad electroforética y luego se hibridan con sondas específicas marcadas. Son altamente reproducibles pero requieren cantidades altas de ADN.

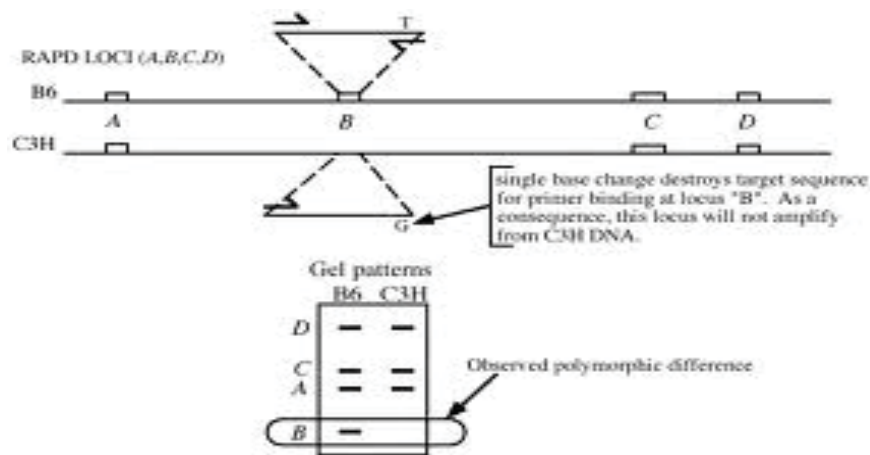


**Figura 7.** Esquema de un RFLP, donde se observan los diferentes sitios de corte entre dos secuencias de ADN. Fuente: Jean-Pierre Herveg (Université de Louvain), [genemol.org/biomolespa/Enzimas/enzimas-de-restricc.html](http://genemol.org/biomolespa/Enzimas/enzimas-de-restricc.html).



RAPD

La RAPD consiste en la amplificación de secuencias de ADN con un cebador de 10 pb aleatorias que hibrida con el DNA (**Fig. 8**). Posteriormente se visualizan en un gel de agarosa. Las diferencias en el patrón de bandas entre individuos evidencian diferencias en su secuencia de bases.



**Figura 8.** Esquema de un RAPD. Se observan las diferencias en el patrón de bandas de las dos secuencias de ADN comparadas. Fuente: <http://www.informatics.jax.org/silver/figures/figure8-9.shtml>.

**Micropropagación del genotipo deseado**

Pruebas de campo y conservación de germoplasma

Tras las pruebas con marcadores se deben realizar pruebas de campo, es decir, se ha de someter a esas variantes somaclonales de interés a condiciones ex-vitro similares a las que se encontrarán al ser comercializadas (cultivo en macetas). Se ha de analizar la expresión génica en estas condiciones, y ver que se expresa de manera correcta.

También se hace necesario conservar este genotipo de interés, una vez ha superado las primeras pruebas de campo. Se conservará en bancos de germoplasma. Para la especie *Saintpaulia ionantha* se han descrito distintos métodos de conservación de germoplasma basados en la crioconservación. Los más usados para crioconservar stocks de plantas de *Saintpaulia ionantha* son los tratamientos de encapsulación-vitrificación, encapsulación-deshidratación y vitrificación. En estos tratamientos se embebe el explanto en una solución con agentes crioprotectores, previa deshidratación en algunos casos, como son el DMSO, glicerol o la sacarosa, que producen una progresiva pérdida de agua en el explanto sin que pierda viabilidad. Se puede conservar germoplasma proveniente de distintos explantos vegetales, pero lo más recomendable es conservar germo-

plasma mediante crioconservación tomando ápices caulinares, ya que se obtienen los mejores resultados de viabilidad tras la descongelación. En este caso los mejores resultados de conservación de germoplasma y viabilidad de los explantos se obtienen con soluciones de deshidratación (DMSO 10% y sacarosa 0,5 M, o DMSO 5% y sacarosa 0,75 M) seguido de un tratamiento con solución PVS2 (etilenglicol, glicerol y DMSO) (Moges et al, 2003).

En el caso de no ser viable el método anteriormente descrito, económicamente hablando, podría plantearse el uso de agentes retardantes del crecimiento con el fin de mantener el stock de las variantes obtenidas. Se pueden mantener ápices caulinares durante 12 semanas, cultivados en medios con sacarosa 0,18 M, o manitol o sorbitol 0,16 M durante 16 horas de oscuridad y 8 de luz (Moges et al 2003).

#### Estabilización de la variante somaclonal seleccionada

Una vez comprobada la expresión genética correcta se procede a micropropagar esa variante somaclonal para poder comercializarla, pero primero es necesario estabilizar el genotipo. Hay que evitar que aparezcan mutaciones en el cultivo. A continuación se analiza que técnica de micropropagación es más adecuada.

En cuanto a la micropropagación de *Saintpaulia inoantha* a partir de células de callo está descartada. En este caso se obtienen unas altas tasas de variación somaclonal debido a las continuas divisiones de las células desdiferenciadas, que forman el callo (Echenique et al, 2004).

Se podría optar por micropropagar a partir de tejidos meristemáticos como son los segmentos nodales o las yemas axilares y apicales. En este método el poder de micropropagación está limitado, ya que han de obtenerse los tejidos meristemáticos de la planta madre, y estos no son demasiado numerosos. Por otro lado, este método de micropropagación muestra buenas tasas de regeneración de planta para *Saintpaulia inoantha* especialmente usando segmentos nodales como explanto, y además la tasa de variación somaclonal es bastante reducida (Pierik, 1991). De todas maneras, este modo de micropropagación no es el más idóneo para conseguir una gran cantidad de planta.

En el caso de optar por la micropropagación directa partir de explantos de hojas o pétalos de *Saintpaulia inoantha* se ha observado cierta variación en el número de flores por plantas, morfología de la flor y periodo de floración, pero no así en cuanto a la coloración de las flores (Jain et al, 1998). En este caso el poder de micropropagación es mucho mayor que partiendo de explantos de tejido meristemático. La micropropagación por vía directa nos da la posibilidad de

inducir sobre el explanto un proceso organogénico o embriogénico, aunque en ambos casos se puede producir cierta variación somaclonal. Se ha comprobado que la micropropagación de explantos de hojas en medio de cultivo MS suplementado con BA (0,22 ó 0,5  $\mu\text{M}$ ) produce una alta tasa de formación de tallos. Asimismo tras tres ciclos de cultivo en estas condiciones se observa cómo se estabiliza el número de flores por planta y la coloración de la flor (nunca varía, probablemente debido a la citoquinina usada), pero no así el período de floración o la morfología de las hojas y las flores (Jain, 1997). Si se continúan realizando ciclos de micropropagación a través de la toma de explantos foliares y una posterior inducción de la formación de tallos, se consigue estabilizar el genotipo deseado y que desaparezcan las variantes somaclonales, debidas probablemente a variaciones epigenéticas (Jain, 1993).

#### Micropropagación a gran escala de la variante somaclonal obtenida

En este punto, con el genotipo de interés ya completamente estabilizado se hace necesario realizar de nuevo pruebas de campo. Se testará de nuevo y durante varias generaciones la estabilidad genética, que se había observado ya en condiciones *in vitro*, y la heredabilidad de estos caracteres. Tras superar estas pruebas es necesario conservar dicha variante en un banco de germoplasma, siguiendo el protocolo ya descrito. Se tendrá el genotipo deseado ya estabilizado y listo para micropropagarse en grandes cantidades y comercializarse.

Para la producción del genotipo estabilizado en grandes cantidades se seguirá el mismo protocolo que se señaló con anterioridad, micropropagación por vía directa, debido a su baja tasa de variación y a su alta tasa de producción de vitroplantas. Se inducirá la formación de tallos a partir de explantos foliares, que luego se someten a un tratamiento con auxinas para que se produzca su enraizamiento.



**Figura 9.** La imagen de la izquierda muestra un ejemplar de *Saintpaulia ionantha* cultivada *in vitro*. La imagen de la derecha muestra la planta madre de la que se tomarán los explantos. Fuente: <http://www.invitrocarnivoras.4t.com>.

Las vitroplantas producidas han de aclimatarse a las condiciones ex-vitro, para lo que se hará necesario disponer de un invernadero de aclimatación. En todo este proceso es muy importante el control fitosanitario de distintas plagas que afectan a *Saintpaulia ionantha*, como son distintos hongos (*Oidium*, *Phytium* o *Phytophthora*), nematodos, bacterias (*Erwinia chrysantemi*) e insectos; que pueden afectar a todo el stock de vitroplantas y causar importantes pérdidas económicas. Se hace necesario un control diario de las vitroplantas, poniendo en cuarentena las sospechosas de estar enfermas. Ha de cuidarse el sistema de riego, para evitar una posible infección fúngica. Las plantas no han de estar demasiado próximas entre sí, evitando así la transmisión de enfermedades. Ha de controlarse también la aparición de algunas vitroplantas sin las características deseadas por mutaciones en el cultivo, que reducen la productividad del proceso.

En conclusión, la variación somaclonal se revela como un método eficaz y factible para poder obtener nuevas variedades de *Saintpaulia ionantha*, y en ningún caso se recurre a la transgénesis, sino que se induce un proceso morfogénico o embriogénico en el explanto. Se ha conseguido diseñar un proceso productivo basado en la micropropagación in vitro, que nos permitirá sacar al mercado nuevas variedades de violeta africana, obteniéndose un beneficio económico.

### **Bibliografía**

- Asmara, D.M., Rida, A.S. y Nabila, S.K. 2004. Cryopreservation of African violet (*Saintpaulia ionantha* Wendl.) shoot tips. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*. 40:389-395.
- Bairu, M.W., Aremu, A.O. y Van Staden, J. 2011. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. *Plant Growth Regulation*, 63:147-173.
- Echenique V., Rubinstein C., Mroginski, L, Levitus, G. y Hopp, E. 2004. Parte III, Métodos para generar variabilidad. Biotecnología y mejoramiento vegetal. Editorial INTA (Instituto nacional de tecnologías agropecuarias, Argentina). Páginas 81-96.
- Espino, F.J. y Vázquez, A.M. 1979. Chromosome numbers of *Saintpaulia ionantha* plantlets regenerated from leaves cultured in vitro with caffeine and colchicine. *Euphytica*. 30:847-853.
- Griesbach, R. J. 1997. Flavonoids in *Saintpaulia ionantha* expressing the fantasy mutation. *Phytochemistry*. 48:829-830.
- Moges, A. D., Karam, N. S., Shibli, R. A. 2003. Slow growth in vitro preservation of African violet (*Saintpaulia ionantha* Wendl.). *Advances in Horticulture*

- Science*. 2033: 223-230.
- Jain, S.M. 1993. Somaclonal variation in *Begonia x elatior* and *Saintpaulia ionantha* L. *Scientia Horticulturae*. 54:221-231.
- Jain, S.M. 1997. Micropropagation of selected somaclones of *Begonia* and *Saintpaulia*. *Journal of biosciences*. 22:585-592.
- Jain, S.M., Brar, D.S. y Ahloowalia, B.S. 1998. Sección I, capítulo 2, Somaclonal variation: mechanism and applications in crop. Somaclonal variation and induced mutations in crop improvement. Kluwer Academic Publishers. Reino Unido. Pp. 15-37.
- Molgaard, J.P., Roulund, N., Deichmann, V., Irgens-Moller, L., Andersen, S.B. y Fareslveit, B. 1991. In vitro multiplication of *Saintpaulia ionantha* Wendl. by homogenization of tissue cultures. *Scientia Horticulturae*. 48: 285-292.
- Pierik, R.L.M. 1991. Micropropagation of ornamental plants. *Acta Horticulturae* (ISHS). 289: 45-54.
- Sato, M., Kawabe, T., Hosokawa, M., Tatsuzawa, F. y Doi, M. 2011. Tissue culture-induced flower-color changes in *Saintpaulia* caused by excision of the transposon inserted in the flavonoid 3', 5' hydroxylase (F3050H) promoter. *Plant Cell Reports*. 30:929–939.
- Smith, R.H., Kamp, M. y Davies, R.S. 1980. Reduced plant size of haploid african violets. *In vitro*. 17:385-387.
- Winkelmann, T., Grunewaldt, J. 1995. Analysis of protoplast-derived plants of *Saintpaulia ionantha* H. Wendl. *Plant Breeding*. 114:346–350.
- Hoshino, Y., Nakano, M., Mii, M. 1995. Plant regeneration from cell suspension-derived protoplasts of *Saintpaulia ionantha* Wendl. *Plant Cell Reports*. 14:341-344.
- <http://extension.psu.edu/plant-disease-factsheets/all-factsheets/spanish/enfermedades-de-la-violeta-africana> (acceso 23/4/2012)
- <http://www.infojardin.com/foro/showthread.php?p=2094341> (acceso 24/4/2012)