

PROPAGACION *in vitro* DE LA ESTACIA *Limonium sinuatum*  
CV. 'MIDNIGHT BLUE'

Yvonne del C. Oviedo \*

Eric Guevara \*\*

ABSTRACT

*In vitro* propagation of the static (Limonium sinuatum L.) cv. 'Midnight Blue'. *In vitro* regeneration and multiplication of Limonium sinuatum (static) through axillary buds was evaluated. The buds were prelevated from four stages of development of the plant (three vegetative and one floral) and were cultivated on a Linsmaier and Skoog medium. Three concentrations of BAP (0.0, 0.6, 0.2 mg/L) were evaluated. With the exception of the fourth stage, big losses were observed in the establishment of the cultures. The best response was obtained with 0.6 mg/L BAP. In the buds of the fourth stage cytokinins induced a reversion from floral to vegetative growth. Proliferation of the cultures were initially accelerated with 1.2 mg/L BAP but the treatment induced growth malformation with repeated subcultures. The formation of roots with NAA was evaluated. The percentage of rooting explants was low (43%) and tend to decrease with the number of subcultures.

INTRODUCCION

Dentro del género *Limonium* (familia Plumbaginaceae) se encuentran especies herbáceas ornamentales (Stewart y Conring, 1970), la mayoría de ellas nativas del Mediterráneo y de las Islas Canarias (Wilfret *et al.*, 1973). Por el colorido de sus flores, *Limonium sinuatum*

(L.) Miller es una de las especies que se está produciendo a nivel comercial en los Estados Unidos, principalmente en Florida y California (Wilfret *et al.*, 1973; Warren, 1980). En ciertas épocas (noviembre a mayo) se presenta un faltante interno en el suministro de esta planta, por lo que es importada de varios países americanos y de otros continentes. Por ello, su producción a nivel comercial en el país ofrece buenas perspectivas.

La propagación comercial de plantas por medio del cultivo de tejidos es una práctica común hoy en día (Murashige, 1974). En el caso de la estacia, la propagación *in vitro* sería de gran beneficio debido a la gran variación genética que presenta. Esta técnica permitiría obtener clones en forma rápida y con un genotipo seleccionado.

Harazy *et al.* (1985) propagaron plantas de estacia *in vitro* a partir de yemas axilares

1/ Recibido para publicación el 16 de junio de 1988.

\* Escuela de Biología del Centro Regional Universitario de Chiriquí, Universidad de Panamá. Chiriquí, Panamá.

\*\* Centro de Investigaciones Agronómicas de la Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica. Beneficiario del Programa de Apoyo a Investigadores que patrocina el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICIT) de Costa Rica.

y obtuvieron una alta tasa de supervivencia. Una concentración de 0,6 mg/L de BAP en un medio Linsmaier y Skoog indujo un mayor número de tallos, y al sustituir el BAP por 0,5 mg/L de ANA se propició la formación de raíces en esos tallos.

En el presente trabajo se buscó realizar en nuestras condiciones la propagación *in vitro* de la estaticia a partir de yemas vegetativas y florales bajo diferentes niveles de reguladores con el fin de observar el efecto del estado fisiológico del explante sobre el desarrollo del mismo.

## MATERIALES Y METODOS

Se utilizaron yemas axilares del cultivar 'Midnight Blue'. Las yemas fueron tomadas de plantas en 4 estados fisiológicos diferentes. En el primero, las plantas se encontraban en crecimiento vegetativo temprano. Ya en el segundo podían observarse los hipsófilos (hojas modificadas muy cerca de las estructuras florales). En el tercer y cuarto estado la planta presentaba ejes florales, el tercero en preantesis y el cuarto en el inicio de la antesis.

En los estados 1, 2 y 3, las plantas se lavaron con agua; se les cortó las hojas, dejando rosetas de 2,7 a 6,5 cm de diámetro, según el estado fisiológico. En el cuarto estado se tomaron secciones de 4 cm distales de tallos florales no mayores de 15 cm de longitud. Todas las muestras se lavaron en una solución de jabón detergente y Tween-80 (0,1%) por espacio de 20 minutos, siendo posteriormente enjuagadas con agua corriente durante 30 minutos. En los estados 1, 2 y 3 se extrajeron cuidadosamente las yemas axilares de la roseta con ayuda de un bisturí #11, mientras que en el cuarto estado se tomaron secciones de tallos florales de 2 a 3 cm de largo. Los tres primeros estados fueron desinfectados con una solución de hipoclorito de sodio (0,5% v/v) con Tween 80 (0,1%) durante 20 minutos. Para el cuarto estado se utilizó una solución de hipoclorito de sodio al 0,75%. Una vez desinfectados, los explantes se llevaron a la cámara de transferencia en donde, después de tres lavados con agua destilada estéril, se procedió a la disección de las

yemas axilares. Cada yema se depositó en un tubo de ensayo de 18 mm de diámetro conteniendo 10 ml de un medio de cultivo solidificado. Los tubos se colocaron en una cámara de crecimiento, a una temperatura de 24° C en el día y 22° C en la noche, con una humedad relativa de 70% y una intensidad lumínica de 40 E/s/m<sup>2</sup> con un fotoperíodo de 12 horas.

Debido a la alta contaminación se repitió el experimento pero introduciendo ciertas variantes en la desinfección. Una vez extraídas las yemas, se procedió a disectarlas y colocarlas en una solución con Tritón-80 al 0,1% por 20 segundos y luego en hipoclorito de sodio al 0,15% por 1 minuto. Seguidamente los explantes fueron incubados por 24 horas en un medio Linsmaier y Skoog (LS) sin reguladores (medio blanco). Transcurrido este período se removieron y colocaron nuevamente en una solución de Tritón-80 al 0,1% por 40 minutos. Finalmente se traspasaron a tubos de ensayo conteniendo un medio LS con 0,6 y 1,2 mg/L de 6-BAP.

El medio de cultivo fue el de Linsmaier y Skoog (1965), con una adición de 30 g/L de sacarosa y 8 g/L de agar. Se autoclavó a una presión 1,5 km/cm<sup>2</sup> y a una temperatura de 121° C durante 20 minutos. Para multiplicar la planta se estudió el efecto de tres concentraciones de citoquinina BAP (6-bencil-aminopurina): 0,0; 0,6 y 1,2 mg/L. Las transferencias a un medio fresco se efectuaron cada tres a cuatro semanas. A partir de la tercera transferencia se utilizaron frascos de 5,0 cm de diámetro conteniendo 20 ml del medio de cultivo. Las plantas obtenidas fueron luego transferidas a un medio con 0,5 mg/L de la auxina ANA (ácido naftalenacético), para inducir el enraizamiento (Harazy *et al*, 1985).

## RESULTADOS

### Contaminación de los cultivos

El crecimiento de la estaticia en forma de roseta adherida al suelo facilita la acumulación de patógenos y dificulta la efectiva desinfección del explante. La contaminación por bacte-

Cuadro 1. Porcentaje de contaminación de los cultivos de *Limonium sinatum* según el estado de la yema, a los 8 y 30 días después de iniciados los cultivos.

Estado	Presencia de bacterias		Presencia de hongos	
	8*	30	8	30
1	89**	100	31	48
2	82	100	39	49
3	69	100	41	51
4	25	27	23	29

\* días después de iniciado el cultivo.

\*\* resultados provenientes del cultivo de 100 explantes por estado.

Cuadro 2. Efecto del método de desinfección de Jones *et al.* (1977) modificado, sobre la sobrevivencia de explantes de *Limonium sinuatum* provenientes de los tres primeros estados.

Estado	No. de explantes		Presencia de bacterias
	Inicial	40 días	
1	50	2	1/1
2	50	2	1/2
3	50	5	2/5

ria fue observada muy rápidamente, siendo a los 8 días casi completa en los estados 1 y 2. Después de treinta días fue de 100% en los tres primeros estados mientras que en el cuarto fue únicamente de 27% (Cuadro 1). La contaminación por hongos fue entre 48% y 51% en los tres primeros estados y de 29% en el cuarto (Cuadro 1). En todos los casos, los explantes contaminados murieron rápidamente y fueron desechados.

Los explantes contaminados por bacteria en baja incidencia crecieron y proliferaron, por lo que en algunos casos se pudo realizar varias transferencias sucesivas. No se observó efecto visual de deterioro de los explantes por la bacteria. Esta fue identificada como perteneciente al género *Pseudomonas*, pero no se pudo carac-

terizar la especie (Uribe, L. 1988. Comunicación personal, Facultad de Microbiología, UCR). Al efectuarse la primera transferencia, los explantes contaminados con bacteria fueron sometidos a una segunda desinfección con hipoclorito de sodio al 0,5%. No se observó síntomas de daño en los tejidos y se logró disminuir la cantidad inicial de inóculo bacteriano en el medio.

Con el fin de buscar un método de desinfección más eficiente se repitió el experimento para los tres primeros estados utilizando el método de desinfección de Jones *et al.* (1977). El Cuadro 2 muestra que el método, aunque más efectivo, no permitió obtener un número suficiente de explantes sanos.

En ninguno de los tratamientos y de los estados hubo problemas de oxidación.

### Desarrollo de yemas provenientes de los tres primeros estados

A pesar de la presencia bacteriana, los explantes de los tres primeros estados continuaron su crecimiento. A los 20 días después de la siembra se observó en el primer estado que, en ausencia de BAP, las yemas presentaron de 1 a 4 hojas con un tamaño promedio de 0,75 cm y en algunos casos hasta 1,5 cm de longitud (Figura 1a). En presencia de 0,6 y 1,2 mg/L de BAP se observó una mayor formación de hojas, de 1 a 6 y de 4 a 8 respectivamente, pero con un tamaño menor (0,62 cm y 0,54 cm) (Figura 1b y c). En el estado 2 con 0,6 mg/L de BAP los explantes presentaron hojas más grandes y en mayor número, contrario a lo observado con 0 y 1,2 mg/L de regulador. En el caso del tercer estado, todos los tratamientos presentaron explantes con hojas de tamaño similar pero una mayor proliferación de las mismas se presentó con 0,6 mg/L de BAP (Cuadro 3).

Después de la segunda transferencia no se pudo evaluar claramente el comportamiento de los explantes ya que se presentó una alta contaminación de tipo fungoso en el primer experimento, la cual provocó la muerte de la mayoría del material al cabo de dos semanas. No obstante hasta esa fecha se notó una tendencia al aumento en el número de hojas en todos los tra-

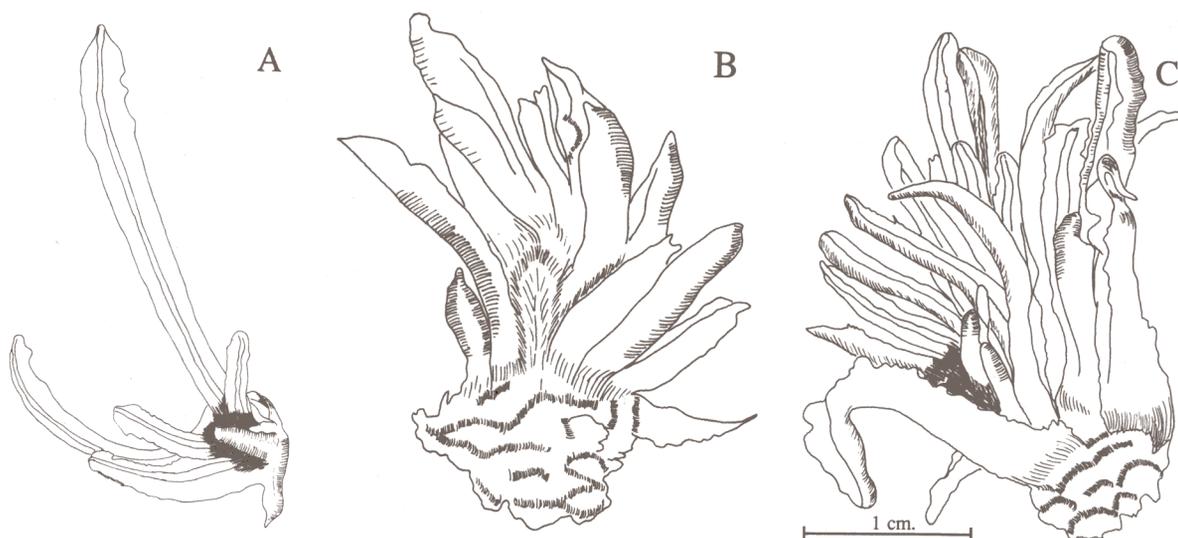


Fig. 1. Respuesta de yemas de *Limonium sinuatum* en los tres primeros estados de desarrollo en presencia de a) 0,0; b) 0,6 y c) 1,2 mg/L de BAP en el medio de cultivo. Resultados observados después de 20 días de iniciado el experimento.

Cuadro 3. Variaciones cuantitativas de las hojas de explantes de *Limonium sinuatum* en tres diferentes estados fisiológicos.

Estado	mg/L	7 días de cultivo			20 días de cultivo		
		No. hojas/ explante	Tamaño medio*	Rango	No. hojas/ explante	Tamaño medio*	Rango
1	0,0	1-3	0,36	0,1-0,7	1-4	0,75	0,2-1,5
	0,6	1-3	0,32	0,2-0,6	1-6	0,62	0,2-1,0
	1,2	2-4	0,29	0,2-0,6	4-8	0,54	0,2-1,2
2	0-0	1-3	0,24	0,2-0,4	1-3	0,48	0,2-1,0
	0,6	1-6	0,40	0,2-0,6	3-6	0,62	0,2-1,2
	1,2	1-5	0,29	0,1-0,5	1-5	0,42	0,2-0,7
3	0,0	2-4	0,36	0,3-0,4	2-4	0,46	0,3-0,5
	0,6	3	0,50	0,5	8	0,48	0,3-1,0
	1,2	3-4	0,29	0,2-0,5	2-5	0,46	0,2-0,9

\* cada tratamiento constó de 25 explantes.

tamientos, siendo en el estado 3 en donde hubo mayor formación de las mismas, pero de dimensiones menores.

Esta tendencia se mantuvo en los explantes sanos del segundo experimento, en el cual, para los estados 1, 2 y 3, se observaron las si-

Cuadro 4. Características de los explantes del estado 4 de *Limonium sinuatum* al final de la segunda transferencia.

Tratamiento (mg/L)*	No. inicial explantes	Longitud promedio (cm)		Explantes con crecimiento vegetativo **		
		Inicial	40 días	4s	8s	12s
0,0-0,6-0,6	8	0,24	0,51	0/8	2/8	5/8
0,6-0,6-0,6	5	0,20	0,48	0/5	5/5	5/5
1,2-1,2-1,2	8	0,24	0,55	6/8	7/10	9/11

\* Cada flecha indica la transferencia de los explantes a un medio de cultivo fresco.

\*\* Número de explantes vegetativos sobre el número total de explantes sanos.

s Tiempo expresado en semanas.

güentes tendencias: en los tratamientos sin regulador hubo crecimiento en longitud de las hojas, pero no se observó un aumento en el número de las mismas. Una transferencia al mismo medio después de cuatro semanas provocó una disminución del crecimiento o un cese total, y luego un amarillamiento del explante. Por el contrario, al realizar la transferencia a un medio con 0,6 mg/L de BAP, se observó un aumento en el número de hojas. En presencia de 1,2 mg/L los explantes presentaron en general un aspecto clorótico y poco desarrollado, las hojas tendieron a ser más angostas y a presentar un encorvamiento en su parte distal. La mejor respuesta fue observada al utilizar un medio de cultivo conteniendo 0,6 mg/L de BAP. Estos presentaron un mejor desarrollo, una mayor proliferación de hojas y una adecuada pigmentación clorofílica.

#### Desarrollo de yemas provenientes del cuarto estado

En el cuarto estado las yemas florales cultivadas en un medio sin regulador mostraron un crecimiento muy reducido (0,14 cm después de 30 días de cultivo). En la mayoría de los explantes se pudo observar el desarrollo de un eje floral en miniatura;

otros explantes murieron. Cuando algunas de las yemas fueron transferidas, después de 30 días, a un medio con 0,6 mg/L de BAP, en la mayoría de ellas el proceso floral siguió su desarrollo y se observaron ejes verdes con pequeñas estructuras semejantes a brácteas, ricas en pigmentos antocianicos (Cuadro 4). Cuando las yemas florales se colocaron inicialmente en un medio con 0,6 mg/L de BAP, se observó un crecimiento limitado antes de la primera transferencia (Cuadro 4). Los explantes se tornaron cloróticos (50%), verdes y rojizos (12,5%) o totalmente rojos (37,5%). Al transferir dichos explantes después de 30 días a un nuevo medio con la misma concentración de regulador, se observó una ligera tendencia a revertir el proceso floral hacia un crecimiento vegetativo. Al final de la primera transferencia el explante mostró un aumento importante de volumen en su base y presentó un gran número de brácteas de coloración rojo y verde. En dos explantes se notó una pequeña sección distal con características vegetativas (yemas con hojas pequeñas verdes) (Figura 2). Después de 12 semanas la mayoría de los explantes (Cuadro 4) presentó este tipo de comportamiento, hasta inclusive la formación de múltiples rosetas vegetativas. Esta misma tendencia se notó en los explantes cultivados con 1,2 mg/L de BAP, aunque el crecimiento inicial fue mayor (Cuadro 4) y la reversión del proceso floral



Fig. 2. Respuesta de yemas de *Limonium sinuatum* en el cuarto estado de desarrollo, después de tres semanas de cultivo en presencia de 1,2 mg/L de BAP.

más definido en la mayoría de los explantes. Este se acrecentó al transferirlos explantes al mismo medio de cultivo (Cuadro 4).

### Multiplicación de los explantes

Con excepción de algunos cultivos provenientes del estado 3, la gran mayoría de los explantes utilizados en la fase de multiplicación provinieron de yemas en estado 4.

Después del tercer subcultivo los explantes, bajo la influencia del BAP, formaron un gran número de yemas que a su vez desarrollaron hojas y le dieron la apariencia de un pequeño "arbusto" (Figura 3). Estos arbustos, compuestos por múltiples rosetas de cultivo pueden dividirse al cabo de tres a cuatro semanas de cultivo en varias unidades más



Fig. 3. Crecimiento y multiplicación de yemas de *Limonium sinuatum* después de tres subcultivos en presencia de BAP.



Fig. 4. Fragmentación y división de los "arbustos" de la Figura 3. Las bases conteniendo algunos tallos serán colocados nuevamente en el medio de multiplicación. Los tallos separados individualmente serán transferidos a un medio de enraizamiento.

pequeñas (Figura 4), las cuales pueden ser nuevamente colocadas en un medio fresco, iniciando un nuevo proceso de multiplicación.

El Cuadro 5 muestra el efecto de diferentes tratamientos con citoquinina sobre el tiempo necesario para iniciar la fragmentación del explante inicial. Con concentraciones de 0,6 mg/L de BAP el crecimiento fue más lento, siendo necesario cinco subcultivos para obtener un número suficiente (62%) de explantes en división. Altas concentraciones iniciales de BAP (1,2 mg/L) promovieron el mayor crecimiento del explante y permitieron iniciar su fragmentación a partir del tercer subcultivo. En general es necesario cuatro subcultivos para

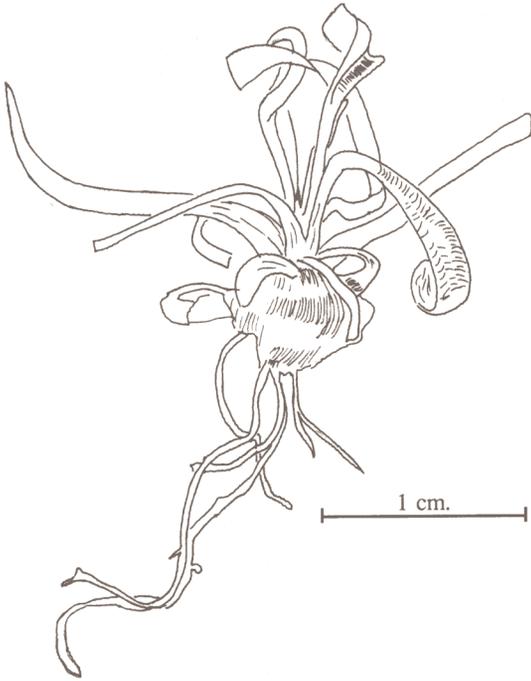


Fig. 5. Formación de raíces en una roseta de *Limonium sinuatum* obtenida a partir de una yema axilar. Observación realizada después de cuatro semanas de cultivo.

Cuadro 5. Efecto del tratamiento con BAP sobre el número de subcultivos necesarios para subdividir el explante inicial de *Limonium sinuatum*.

Tratamiento (mg/L)		No. de cultivos	Explantes divididos** en los subcultivos			
Inicial	Posterior		3	4	5	6
0,6	0,6	8	-	12,5	62,5	87,5
0,0	0,6	5	-	20,0	60,0	60,0
1,2(2)*	0,6	4	25	50,0	50,0	50,0
1,2(3)	0,6	7	-	57,0	57,0	57,0

\* el número entre paréntesis indica el número de subcultivos realizados a una concentración de 0,6 mg/L.

\*\* expresado en porcentaje.

iniciar una multiplicación satisfactoria de los explantes. Sin embargo, con dosis iniciales elevadas de BAP sólo 50 a 60% de los explantes pudieron dividirse y multiplicarse de manera satisfactoria, en comparación con 87% obtenido con 0,6 mg/L de BAP. Después del cuarto subcultivo, en todos los tratamientos se observó una mayor oxidación de los

explantes así como la presencia de desórdenes fisiológicos como vitrificación (Debergh y Maene, 1984; Debergh *et al.*, 1981). Estos problemas se notaron con mayor frecuencia en los tratamientos con 1,2 mg/L de BAP.

### Enraizamiento de los explantes

Al iniciarse el proceso de fragmentación de los explantes, un cierto número de rosetas fueron separadas y cultivadas en un medio con 0,5 mg/L de ANA. La formación de raíces ocurrió en un lapso aproximado de dos semanas (Figura 5). El Cuadro 6 muestra los resultados de rosetas puestas a enraizar luego de tres y seis subcultivos (12 y 24 semanas, respectivamente). En el primer caso el porcentaje de enraizamiento fue de 42%, observándose que los explantes cultivados inicialmente con 0,6 mg/L de BAP presentaron el mejor resultado (62%). En el segundo experimento, el número de rosetas con raíces fue considerablemente menor (6%). El mejor resultado en este caso fue a partir de explantes cultivados previamente con 1,2 mg/L de BAP. Aquellos transferidos a un medio sin reguladores mostraron un crecimiento vigoroso y las hojas alcanzaron más de 3 cm, sin embargo, al ser transferidas al medio con ANA no se logró inducir la formación de raíces (Cuadro 6). Cabe hacer notar que, aún sin presencia de raíces, las rosetas continuaron su desarrollo y formaron nuevas hojas, aunque no se observó el desarrollo de nuevas yemas.

### DISCUSION

En condiciones tropicales, la contaminación de los cultivos *in vitro* representa un obstáculo más difícil de eliminar que en condiciones de clima templado. La elevada humedad relativa así como la presencia de temperaturas estables para el crecimiento, sin cambios bruscos, durante todo el año, favorecen condiciones ideales para la multiplicación y desarrollo de microorganismos.

En la estaticia, la contaminación inicial representa un serio problema para su establecimiento *in vitro*. Su crecimiento en roseta adherida al suelo favorece el contacto con microorganismos en forma directa (suelo) e indirecta (salpicaduras). Muchos hongos y bacterias, presentes generalmente

Cuadro 6. Efecto de 0,5 mg/L de ANA sobre el enraizamiento de explantes de *Limonium sinuatum*, provenientes del estado cuatro. Resultados obtenidos después de tres semanas.

Tratamiento		Edad de los cultivos	
Inicial	Posterior	12 semanas	24 semanas
0,6	0,6	10/16 (62,5%)	1/27 (93,7%)
1,2	0,6	13/35 (37,1%)	0/20 (0%)
1,2	1,2	2/6 (33,0%)	4/18 (22%)
0,0	0,6	1/4 (25,0%)	0/2 (0%)
0,6	N**	***	0/20 (0%)
Total explantes		26/61 (61,0%)	5/87 (6%)

\* Tratamiento aplicado después de la tercera transferencia.

\*\* Explantes transferidos a un medio desprovisto de reguladores previo al tratamiento de enraizamiento

\*\*\* No realizado

sobre la superficie del vegetal en forma saprófita, son depositados en el medio de cultivo junto con el material de propagación. Estos crecen y se desarrollan y afectan al explante de una manera indirecta (proliferación, saturación, producción de desechos metabólicos tóxicos) (Debergh y Maene, 1984). En el caso de las bacterias observadas en la estaticia, es probable que pertenezcan a este último tipo de contaminación. La transferencia a un medio fresco reduce la fuente inicial del inóculo bacteriano y favorece el crecimiento del explante, sin deterioro visible. La tolerancia a microorganismos en el medio de cultivo ha constituido en ciertas especies la única manera de poder realizar su cultivo *in vitro* (Monette, 1986; Debergh y Maene, 1984). Ciertos investigadores han incluso observado en presencia de bacterias del género *Pseudomonas* un mayor crecimiento inicial del explante y lo relacionan con una mayor liberación de citoquininas en el medio (Yves Mazieres, 1983. Comunicación personal, Laboratories Delbard, Francia).

Sin embargo, la presencia de contaminantes, aunque de lento crecimiento, no es conveniente, ya que pueden llegar a producir, eventualmente, toxinas o estimulantes que lleguen a afectar el crecimiento normal en la célula o producir mutaciones (Butcher e Ingram, 1976; Debergh y Maene, 1984). En el caso de la estaticia, la "inocuidad" de

la bacteriadeseapareció al introducir en el medio una auxina, ya que todos los explantes murieron.

Las yemas del cuarto estado (o yemas florales) constituyen el mejor material para iniciar cultivos *in vitro* de *Limonium sinuatum*. Por su posición en la planta presentan una menor exposición a los microorganismos, lo que permite un mejor control de la contaminación. Debe tomarse en cuenta que mediante el cultivo de plantas en invernadero y con un control fitosanitario más estricto puede ser posible cultivar otras partes de la estaticia libres de patógenos.

Los otros tres tipos de yemas presentaron un comportamiento similar. La presencia de BAP resultó indispensable para el crecimiento. En su ausencia, la yema puede presentar una elongación y desarrollo de los primordios foliares, pero su actividad cesa luego, adquiere una coloración amarillenta y finalmente muere. La mejor respuesta en los estados uno, dos y tres se obtuvo con el tratamiento con 0,6 mg/L de BAP, lo cual concuerda con lo obtenido por Harazy *et al.* (1985). Dosis mayores o menores provocaron una apariencia clorótica del explante, el cual llega a necrosarse. La transferencia de estos explantes a un medio con 0,6 mg/L de BAP permite una recuperación del explante, que inicia un nuevo desarrollo y se multiplica.

Las yemas del cuarto estado revierten el desarrollo inicial de tipo floral en presencia de citoquininas. Dependiendo de la concentración de BAP, el proceso puede ser más o menos rápido. Las citoquininas ejercen un efecto antagónico sobre la floración, promoviendo el desarrollo de yemas vegetativas (Krekule, 1979; Leopold y Nooden, 1984). El desarrollo vegetativo sobre el eje floral de la estaticia ha sido también observado en condiciones de campo (Oviedo, 1988). El hecho de que dosis de 1,2 mg/L de BAP aceleran el proceso de reversión floral puede deberse a un gradiente endógeno muy elevado (Krekule, 1979), el cual, con dosis más bajas, requiere mayor tiempo.

Dosis altas también promueven el inicio de la división de los explantes en forma más rápida. Sin embargo el cultivo prolongado en estas condiciones promueve la aparición de síntomas anormales como oxidación y vitrificación. Este último fenómeno ha sido observado en muchas plantas cultivadas *in vitro* (Debergh *et al.*, 1981; Debergh y Maene, 1984; Beauchesne, 1981). Aunque sus causas exactas no están todavía definidas, es probable que las citoquininas en altas concentraciones favorezcan su aparición (Debergh, 1987). Esta sintomatología es indeseable, ya que las plantas en esta condición no forman raíces y no pueden ser transplantadas a condiciones de campo (Debergh y Maene, 1984). La transferencia de los explantes después de uno o dos subcultivos con 1,2 mg/L a un medio con 0,6 mg/L atenúa este efecto y constituye una posibilidad de multiplicación más rápida. Si bien el número inicial de explantes que pueden dividirse es menor, esto no constituye una dificultad importante, por cuanto es posible iniciar la multiplicación rápida a partir de un solo explante.

Los síntomas de vitrificación fueron también observados (aunque en menor grado) en tratamientos de 0,6 mg/L de BAP y se acentuaron cuando los cultivos permanecieron sin transplantar más de cuatro semanas. Esto implica la necesidad de investigar el subcultivo prolongado con concentraciones menores de BAP. Es probable que la tasa de multiplicación se reduzca, pero permitiría la obtención de plantas de mayor calidad después de varias transferencias sucesivas.

El porcentaje de enraizamiento del material disminuyó conforme aumentó el número de subcultivos. Este resultado no concuerda con los datos

obtenidos por Harazy *et al.* (1985), quienes observaron lo contrario. La fuerte disminución del número de plantas con raíz puede atribuirse al uso prolongado del BAP (Debergh, 1987). Sin embargo, el mayor número de explantes enraizados obtenidos en el segundo ensayo fue observado con dosis de BAP altas. Por otra parte, se esperaba una mejor respuesta de enraizamiento en los explantes cultivados en un medio desprovisto de reguladores, lo cual no sucedió. Es probable que la concentración o el tipo de auxina empleada (ANA) no sea el adecuado. Ciertos investigadores han observado una disminución de los requerimientos en auxina conforme aumentan los subcultivos (Borgman y Mudge, 1986). Se han obtenido en efecto variaciones importantes en el comportamiento *in vitro* de una misma especie de un laboratorio a otro (Navatel, J.C. 1985. Comunicación personal, C.T.I.F.L., Francia). Estas variaciones, debidas probablemente a condiciones de cultivo nunca idénticas entre los laboratorios (espacio físico, condiciones atmosféricas, manipulación específica del material, etc.) hacen necesario el estudio preliminar de su cultivo *in vitro* para una región específica.

Los resultados iniciales obtenidos en el presente trabajo, demuestran la posibilidad de obtener plantas de estaticia por medio del cultivo *in vitro* de yemas axilares. Es necesario, sin embargo, continuar la investigación en cuanto a los aspectos de enraizamiento y adaptación al campo. Estas investigaciones se presentarán en próximos trabajos.

## RESUMEN

Se estudió la regeneración y multiplicación *in vitro* de *Limonium sinuatum* utilizando yemas. Para ello se extrajeron yemas axilares en cuatro estados de desarrollo de la planta (tres vegetativos y una floral) y se estudió su respuesta a tres concentraciones de BAP (0,0; 0,6 y 1,2 mg/L) en un medio de Linsmaier y Skoog. La contaminación tanto por bacterias como por hongos representó una dificultad importante en la fase de establecimiento de los cultivos. Las mejores respuestas se observaron con 0,6 mg/L de BAP. En todas las dosis estudiadas la citoquinina provocó la reversión

del proceso floral en las yemas del cuarto estado. El uso de 1,2 mg/L de BAP aceleró en todos los estados la multiplicación de los cultivos, pero utilizada en forma continua esta dosis puede causar malformaciones. El enraizamiento de los explantes no fue satisfactorio, disminuyendo con el número de transferencias. Se discuten las causas posibles de esta reducción en la formación de raíces y la necesidad de evaluaciones de los cultivos por períodos prolongados.

#### LITERATURA CITADA

- BEAUCHESNE, G. 1981. Les milieux minéraux utilisés en culture *in vitro* et leur incidence sur l'apparition de bouture d'aspect pathologique. C.R. Acad. Agric. France 67: 1389-1397.
- BORGMAN, C.A.; MUDGE, K.W. 1986. Factors affecting the establishment and maintenance of "Titan" red raspberry root organ cultures. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 6: 127-137.
- BUTCHER, D.N.; INGRAM, D.S. 1976. Plant tissue culture. Londres, Edward Arnold (Publishers). 66 p.
- DEBERGH, P. 1987. Improving micropropagation. Newsletter (I.A.P.T.C.) 51:2-10.
- DEBERGH, P.; MAENE, L. 1984. Pathological and physiological problems related to the *in vitro* culture of plants. Parasitica 40(2-3):69-75.
- DEBERGH, P.; HARBAQUI, Y.; LEMEUR, R. 1981. Mass propagation of globe artichoke (*Cynara scolymus*): Evaluation of different hypothesis to overcome vitrification with special reference to water potential. Physiologia Plantarum 53:181-187.
- HARAZY, A.; LESHEM, B.; COHEN, A.; RABINOWITZ. 1985. In vitro propagation of statice as an aid to breeding. HortScience 20(3): 361-362.
- JONES, O.P.; HOPGOOD, M.E.; O FARRELL, D. 1977. Propagation *in vitro* of M.26 apple rootstocks. J. Hort. Sci. 52:235.
- KREKULE, J. 1979. Stimulation, inhibition de la floraison: études morphologique et physiologique. In La physiologie de la floraison. Coloquio C.N.R.S. no.285.Paris, Ediciones del C.N.R.S. p.19-59.
- LEOPOLD, A.C.; NOODEN, N.D. 1984. Hormonal regulatory systems in plants. In Hormonal regulation of development. II. The functions of hormones from the level of the cell to the whole plant. Ed. by K. Scott. Berling. Springer-Verlag. p.1-23.
- LINSMAIER; SKOOG, F. 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 18:100-127.
- MONETTE, P.L. 1986. Micropropagation of kiwifruit using non-axenic shoot tips. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 6:73-82.
- MURASHIGE, T. 1974. Plant propagation through tissue culture. Annual Rev. Plant Physiol. 25:135-166.
- OVIEDO, I. del C. 1988. Algunos aspectos sobre la biología de *Limonium sinuatum* (L.) Miller. Tesis Mag. Sc. SEP, Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica.
- STEWART, D.; CONRING, M. 1970. Manual of the vascular plants of Texas. Texas Research Foundation Reuner, p. 1185-1186.
- WARREN, C. 1980. Minor cut crops. In Introduction to floriculture. Ed. by R.A. Larson, New York, Academic Press. p.204-205.
- WILFRET, G.J.; RAULSTON, J.C.; POE, S.L.; ENGELHARD, A.W. 1973. Cultural technique for the commercial propagation of annual statice (*Limonium sinuatum*) in Florida. Proc. Fla. State Hort. Soc. 86:399-404.