

MICROPROPAGACIÓN DE *Echinacea purpurea* A PARTIR DE BROTES Y SEMILLAS¹

Jorge Loaiza, Roberto Valverde^{2/*}, Luis Gómez*

Palabras clave: *Echinacea*, micropropagación, aclimatización, Costa Rica.

Keywords: *Echinacea*, micropropagation, acclimatization, Costa Rica.

Recibido 29/04/04

Aceptado 17/06/04

RESUMEN

Con el objetivo de generar un protocolo para la micropropagación de la planta medicinal *Echinacea purpurea*, fueron evaluadas concentraciones de NaOCl: 0,75, 1,5, 3 y 5% en combinación con 10, 15, 20, 25 y 30 min. de inmersión para la desinfección de los explantes. Los resultados mostraron que la combinación de 5% de NaOCl con 25 min de inmersión, controló la contaminación en un 100%. Inicialmente, el medio basal de Murashigue y Skoog (1962) fue evaluado a 25, 50, 75 y 100% de la concentración de sales. La mitad de las sales (MS/50) resultó en un mejor crecimiento de los explantes. Por tal motivo, este medio fue suplementado con 0,1, 0,5, y 1 mg l⁻¹ de 6-bencilaminopurina (BAP) para la proliferación de brotes. La mayor tasa de multiplicación, de 12 brotes por explante cada 6 semanas, se obtuvo en el medio con 0,5 mg l⁻¹ de BAP. El efecto del ácido-3-indol-acético (AIA) también fue estudiado. Un 100% de enraizamiento con 45% de raíces mayores a 3 cm, se logró con el uso de 3 mg l⁻¹ de AIA. Después de 8 semanas de aclimatización, la sobrevivencia de los brotes enraizados en el invernadero fue del 100%.

ABSTRACT

Micropropagation of *Echinacea purpurea* using lateral shoots and seeds as explants.

To generate a micropropagation protocol for the medicinal plant *Echinacea purpurea*, 0.75, 1.5, 3, and 5% of NaOCl with 10, 15, 20, 25, and 30 min. immersion times were evaluated for disinfection. Results showed no contamination when 5% of NaOCl was used in combination with 25 min immersion. Initially, the basal medium of Murashigue and Skoog (1962) was assessed at 25, 50, 75% and 100% salts strength. The half salts strength (MS/50) proved to be the most effective one, resulting in better growth of explants; therefore, it was supplemented with 0.1, 0.5, and 1 mg l⁻¹ of 6-benzylaminopurine (BAP) for *in vitro* shoot proliferation. A proliferation rate of 12 new shoots per explant was obtained when the medium was supplemented with 0.5 mg l⁻¹ of BAP. The effect of IAA on root induction was also studied. A rooting percentage of up to 100% with 45% roots >3 cm, was achieved by the use of 3 mg l⁻¹ of IAA. After 8 weeks of acclimatization, survival of rooted shoots in the greenhouse was 100%.

1/ El trabajo forma parte de la tesis doctoral del primer autor. Programa de Estudios de Posgrado en Sistemas de Producción Agrícola Tropical Sostenible. Facultad de Ciencias Agroalimentarias. Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.

2/ Autor para correspondencia. Correo electrónico: robertov@cariari.ucr.ac.cr

* Centro de Investigaciones Agronómicas, Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.

INTRODUCCIÓN

Echinacea sp. comúnmente conocida como purple coneflower en Estados Unidos y Canadá y como echinacea en otros países donde se cultiva, es una de las plantas medicinales de mayor importancia en el mercado Europeo, Canadiense y de los Estados Unidos.

Son plantas nativas de Norte América que han sido usadas por cientos de años con propósitos medicinales por los indígenas de esa región.

Diferentes partes de la planta son usadas externamente contra las picaduras de serpientes, insectos y quemaduras (Busing 1952, Hill *et al.* 1996) e internamente para la tos, resfríos, dolor de garganta, infecciones e inflamaciones (Hobbs 1989, 1994).

La mayoría de las investigaciones con echinacea relacionadas con la elucidación de estructuras, actividad biológica y adaptabilidad del cultivo, han sido llevadas a cabo en Canada, Noruega, Estados Unidos (Dragland *et al.* 1993), Rumania (Muntean *et al.* 1992), Finlandia (Galambosi *et al.* 1992), Rusia (Porada *et al.* 1991), y Nueva Zelanda (Parmenter *et al.* 1996). El consumo de echinacea en Europa y Norte América ha tenido un incremento considerable; de hecho, estas plantas son las más vendidas como remedios medicinales, representando un 9,9% de la industria de las hierbas medicinales (Rawls 1996). Adicionalmente, en Alemania se ha confirmado la actividad inmunoestimuladora, antiviral y antibacterial de *E. angustifolia* en humanos (Bauer y Foster 1991, Bodinet y Beuscher 1991, Bodinet *et al.* 1993).

Los principales metabolitos secundarios identificados incluyen alcaloides (Hobbs 1994); alcanoides (Schulthess *et al.* 1991, Perry *et al.* 1997); polisacáridos (Bonadeo *et al.* 1971, Bauer y Wagner 1991); poliacetilenos (Schulte *et al.* 1967, Bauer *et al.* 1988); flavonoides (Christ y Muller 1960, Bauer y Wagner 1991); derivados fenólicos: ácido caféico, ácido cichórico, ácido clorogénico (Hobbs 1989, Bauer y Foster 1991); aceites esenciales (Delabays y Slacanin 1995); y el glicósido equinacósido (Stoll *et al.* 1950).

Las 2 especies de echinacea más cultivadas son *E. purpurea* (80%) y *E. angustifolia* (20%), que también son plantadas como

ornamentales en jardines y producidas comercialmente para flores de corta (Starman *et al.* 1995).

En Costa Rica, durante los últimos 10 años se ha venido incentivando la siembra de *E. purpurea* y *E. angustifolia* y se tienen amplias expectativas para su producción, dado el tiempo tan corto en que la planta completa su ciclo, 12 meses comparado con 36 meses en Norteamérica, y el alto precio que se paga por las raíces y las hojas secas que son producidas para exportación.

Dentro de las principales limitantes que presenta el establecimiento del cultivo de echinacea, están el bajo porcentaje de germinación de las semillas. Smith-Jochum y Albrecht (1987) obtuvieron menos del 10% de emergencia en siembra directa de la semilla y Samfield *et al.* (1991) obtuvieron solo un 39% de germinación a los 28 días. Esta variación en la germinación está relacionada con el peso de la semilla, su madurez, las condiciones ambientales durante el desarrollo de la misma o en el subsecuente almacenamiento, el bajo vigor de la semilla o dormancia. Además, de la variabilidad genética al utilizar semilla sexual como material reproductivo. A esto se une una pérdida de plántulas en los primeros estadios de desarrollo, causada por el ataque de hongos fitopatógenos (Finnerty y Zajicek 1992).

Ante las atenuantes que presenta esta especie para su reproducción por la vía sexual, se planteó como objetivo de esta investigación desarrollar un protocolo para la micropropagación de *E. purpurea*.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología de Plantas del Centro de Investigaciones Agronómicas de la Universidad de Costa Rica.

Material vegetal

Se utilizó semillas y brotes de *E. purpurea*, tomados de plantaciones comerciales establecidas en San Pedro de Santa Bárbara de Heredia, Costa Rica.

Establecimiento

Desinfección. Los brotes y las semillas independientemente, fueron sumergidos por 30 min en una solución de Agrymicin 500 y Benlate, 2 g l⁻¹ de cada uno, con 2 gotas de Tween 80 y mantenidos en agitación. Luego fueron enjuagados 3 veces con agua destilada estéril. Posteriormente, ambos tipos de explante fueron desinfectados con 4 concentraciones de hipoclorito de sodio (NaOCl): 0,75, 1,5, 3 y 5%, en combinación con 5 tiempos de inmersión: 10, 15, 20, 25 y 30 min con agitación constante. En la cámara de flujo laminar fueron enjuagados 3 veces con agua destilada estéril. Por último, se procedió a sembrar las semillas y los brotes en el medio de cultivo.

Medio de cultivo. Para la selección del medio de cultivo se realizó una prueba preliminar con diferentes concentraciones de las sales del medio de cultivo básico de Murashige y Skoog (MS) (1962), se evaluó: 25, 50, 75 y 100%. Producto de estas pruebas fue seleccionado el MS al 50%, en adelante MS/50 (resultados no mostrados).

Los explantes fueron inoculados en un MS/50 suplementado con 3% de sacarosa y 0,8% de agar. El pH del medio fue ajustado a 5,8 antes del autoclavado, el cual se realizó por 25 min a 120°C y a 2 kg cm⁻². El medio fue dispensado en frascos tipo Gerber pequeños.

Condiciones de cultivo. Los tejidos fueron cultivados a una temperatura de 24°C, con un fotoperíodo de 16 h y luz fluorescente a 50 μmol m⁻² s⁻¹.

El ensayo fue dispuesto en un diseño irrestricto al azar con 20 repeticiones por tratamiento. La unidad experimental correspondió a una semilla o un brote, respectivamente. Se evaluó la germinación de semillas, el crecimiento de brotes, y la contaminación.

Multiplicación

El material vegetal utilizado en esta etapa consistió de las plántulas obtenidas de las semillas

germinadas *in vitro* y de los brotes establecidos en la etapa anterior. A ambos tipos de explante se les eliminó las hojas y las raíces, dejando una microstaca de 1,0-1,5 cm; las cuales fueron inoculadas en un MS/50 con: 0,1, 0,5 y 1,0 mg l⁻¹ de 6-bencilaminopurina (BAP).

Se utilizó un diseño irrestricto al azar, con 20 repeticiones, donde cada explante fue considerado como una unidad experimental. Las evaluaciones para determinar el número de brotes obtenido en cada tratamiento fueron realizadas cada 2 semanas y por un período total de 8 semanas, sin que se realizara ninguna renovación del medio de cultivo durante las 8 semanas. Las condiciones de cultivo fueron las mismas de la etapa anterior.

Enraizamiento

Para esta etapa de la investigación se utilizó los brotes obtenidos durante la fase de multiplicación. Los brotes fueron inoculados en un MS/50 suplementado con 1, 2 y 3 mg l⁻¹ de ácido 3-indol-acético (AIA). Para medir el efecto de estos 3 tratamientos, 4 semanas después, fue evaluado el desarrollo aéreo de las plántulas y la longitud de las raíces por brote. Las plántulas fueron ubicadas en 2 grupos según el desarrollo aéreo y radical. Un primer grupo consistió de plántulas cuya altura fue >2 cm, las cuales fueron divididas en 2 sub-grupos según el desarrollo de las raíces: raíces >3 cm y raíces <3 cm de longitud. El segundo grupo consistió de plántulas cuya altura fue <2 cm, al igual que en el caso anterior hubo 2 sub-grupos dependiendo de la longitud de las raíces. Para este experimento se utilizó un diseño irrestricto al azar. La unidad experimental fue un brote y cada tratamiento consistió de 32 repeticiones.

Aclimatización

Las plántulas enraizadas fueron sacadas de los frascos de cultivo y las raíces lavadas con agua abundante para eliminar el medio de cultivo. Posteriormente fueron llevadas al invernadero y sembradas en bandejas que contenían un sustrato compuesto por fibra de coco molida y suelo en proporción 1:1, el cual fue esterilizado por

calor. Una vez en las bandejas, las plántulas fueron colocadas en un túnel de plástico transparente, donde se les aplicó 2 riegos por día. También cada semana las plántulas fueron asperjadas 3 veces, utilizando en forma alterna, uno de los siguientes productos: Raizal (2 g l^{-1}), Multiminerales (2 ml l^{-1}), Urea (2 g l^{-1}), 12-60-0 (5 g l^{-1}) y 20-20-20 (2 g l^{-1}). Cada 3 semanas fue aplicado el fungicida Daconil (5 ml l^{-1}) y 1 vez por semana, en forma alterna, los insecticidas: Basudín (5 ml l^{-1}), Lorsban (2 ml l^{-1}), Vydate ($2,5 \text{ ml l}^{-1}$) y Decis (2 ml l^{-1}).

Las plántulas fueron mantenidas en el túnel por 4 semanas y en el invernadero por 4 semanas más.

Análisis de los datos

Para analizar los resultados se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) y la prueba de comparación de medias de Duncan.

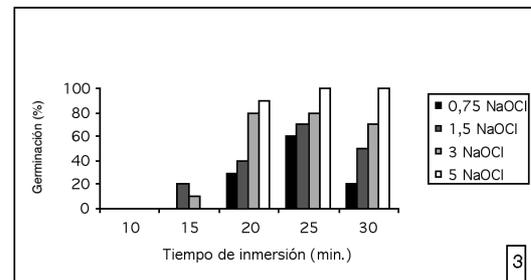
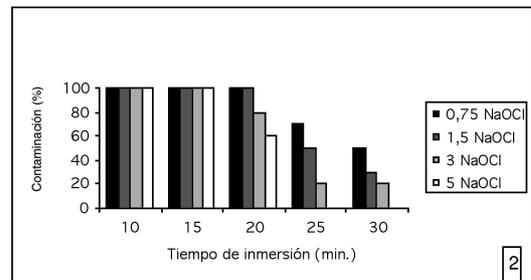
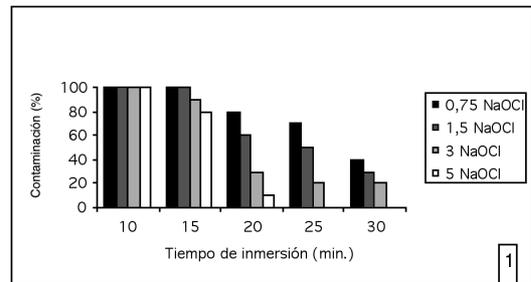
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Establecimiento

Las figuras 1 y 2 muestran el efecto combinado de las diferentes concentraciones de NaOCl y del tiempo de inmersión sobre el porcentaje de contaminación de semillas y brotes, respectivamente. Para ambos órganos, la contaminación, causada por hongos en su mayoría, fue controlada en un 100% cuando se utilizó los tratamientos de NaOCl al 5% por 25 y 30 min.

En la figura 3, se presenta el resultado de los mismos tratamientos de desinfección sobre la germinación de las semillas. Al igual que en el caso anterior fue el tratamiento de 5% de NaOCl en combinación con 25 y 30 min de inmersión donde se obtuvo un 100% de germinación. En general no se presentaron síntomas de oxidación en los explantes.

Según el ANDEVA realizado a los resultados de desinfección de las semillas y de los brotes, existen diferencias a $P \leq 0,05$ entre los tratamientos para las pruebas de contaminación y de germinación.



Figs. 1-3. Efecto del proceso de desinfección sobre 1. La contaminación de semillas 2. La contaminación de brotes 3. La germinación de semillas.

Tanto para la eliminación total de los contaminantes como para el crecimiento y desarrollo de los explantes, se escogió como mejor tratamiento el de 5% de NaOCl en combinación con 25 min de inmersión, debido a que este fue donde los brotes y las plántulas mostraron un crecimiento óptimo. Cuando se utilizó la misma concentración de NaOCl y 30 min de inmersión, los tejidos mostraron daños, los cuales interfirieron con el desarrollo normal de las plántulas. Según Mroginski y Roca (1991) las concentraciones de NaOCl utilizadas para desinfectar los diferentes órganos de la planta varían de 0,5 a 2%. Sin embargo, se debe considerar que en algunos casos, debido a la morfología de la planta y a

las condiciones ambientales en las que crece, se puede acumular una mayor cantidad de contaminantes en los tejidos, máxime si las condiciones son propicias para la proliferación de los mismos. En estos casos, regularmente, se requiere de concentraciones mayores de NaOCl o inclusive de desinfectantes más fuertes como el hipoclorito de calcio o el cloruro de mercurio. Cuando es necesario utilizar concentraciones altas de hipoclorito de sodio, se debe extremar los cuidados, ya que aunque dichas concentraciones podrían eliminar los contaminantes, también podrían dañar seriamente los tejidos, lo que impide un crecimiento normal de los mismos. Por otro lado, el uso de desinfectantes más fuertes, como los antes mencionados, debe realizarse con mucha cautela ya que son altamente tóxicos para los humanos.

Con respecto al medio de cultivo, las pruebas preliminares indicaron que de las 4 concentraciones de las sales del medio básico de Murashige y Skoog (1962) evaluadas, la mayor germinación de semillas, así como el mejor desarrollo de los brotes y las plántulas se obtuvo cuando se utilizó las sales al 50% (MS/50) (Datos no mostrados) (Figura 4). Este resultado es concordante con las observaciones de Harbage (2001) quien encontró que el mejor desarrollo del tallo y las hojas de *E. purpurea* var. Bravado, ocurre cuando se utiliza las sales del medio de cultivo a la mitad de la concentración original.

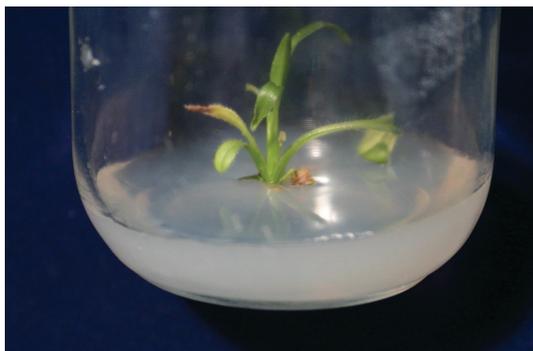


Fig. 4. Brote lateral de *E. purpurea* en la fase de establecimiento.

Cabe mencionar que debido a que las semillas utilizadas en esta investigación fueron obtenidas de plantas creciendo en Costa Rica, no hubo necesidad de efectuar algún tipo de estratificación, caso contrario ocurre con las semillas producidas en las zonas templadas (Harbage 2001, Zinati *et al.* 2000).

Multiplicación

En la figura 5 se muestra el efecto de las diferentes concentraciones de BAP: 0,1, 0,5 y 1 mg l⁻¹ sobre la inducción de brotes. El ANDEVA indicó diferencias a $P \leq 0,05$ entre los tratamientos. El tratamiento con la concentración de 0,5 mg l⁻¹ fue el que mostró la mayor cantidad de brotes con 12 rebrotes por explante a las 6 semanas. Como se puede observar, en la tercera y cuarta evaluación se obtuvo 12 brotes, respectivamente, esa estabilización en el número de brotes por explante a las 8 semanas pareciera indicar que es a las 6 semanas donde esta especie logra su tasa de multiplicación máxima. Aunque existe la posibilidad de que el número de brotes por explante fuera más elevado si se hubiera renovado el medio de cultivo a las 4 semanas. Algunos autores indican que en ciertas especies, luego de un período de estabilización como el aquí observado, los brotes producidos aumentan su potencial de multiplicación, debido posiblemente a un fenómeno de habituación de los tejidos al cultivo *in vitro*. Evans y Bravo (1985) mencionan que muchos tejidos comienzan a producir sus propias citoquininas en estas condiciones, lo que hace que haya una mayor estimulación hacia la formación de brotes axilares y adventicios. En algunas

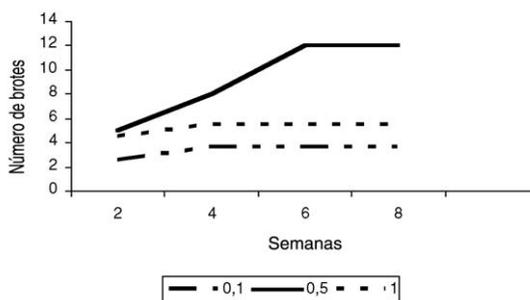


Fig. 5. Diferentes dosis de BAP sobre la inducción de brotes en *E. purpurea*.

plantas esto ha sido considerado una gran ventaja, pues se podría aumentar el número de ciclos de multiplicación; sin embargo, hay especies donde multiplicar los explantes durante muchos ciclos de propagación, está relacionado con el aumento en la frecuencia de aparición de variantes somaclonales. Las causas fundamentales de la variación somaclonal, son la variación asociada a la formación de yemas adventicias, que ocurre en algunas especies, cuya presencia es proporcional al número de sub-cultivos, y la otra es el aumento de la posibilidad de cambios en el nivel de ploidía (Lorz y Scowcroft 1979, Meins 1983, Vasil 1984). Las variaciones en los somaclones que han sido reportadas incluyen cambios en los patrones enzimáticos, la precocidad, el crecimiento, la producción, la calidad, la pigmentación, y la resistencia a factores bióticos y abióticos (Sahijram *et al.* 2003).

Con $0,1 \text{ mg l}^{-1}$ de BAP se obtuvo un máximo de 3,6 brotes a las 6 semanas mientras que con la concentración de 1 mg l^{-1} el número de brotes máximo fue de 5,4 a las 4 semanas. Estos resultados representan solo un 30 y un 45%, respectivamente, de la cantidad de brotes obtenida en el tratamiento con $0,5 \text{ mg l}^{-1}$. Una alta tasa de multiplicación obtenida con un contenido bajo de citoquininas es muy deseable, ya que la tendencia actual en la propagación de plantas, es el empleo de medios de cultivo cada vez más simples, lo que ha sido posible debido al conocimiento, cada vez mayor, que se tiene de los demás factores que influyen en el cultivo *in vitro*. En nuestro caso, la dosis donde se obtuvo los mejores resultados fue de $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ de BAP, la cual es considerada baja; sin embargo, hay trabajos como los de Feldmann *et al.* (1994) quienes lograron la micropropagación de caña de azúcar sin emplear ningún regulador de crecimiento. Esto es importante ya que se reducen los costos de obtención del material de propagación y a la vez se minimiza la variabilidad que se presenta durante el cultivo *in vitro* de esta especie (Villalobos y Arias 1987 a,b). Es muy posible que la búsqueda de medios de cultivo cada vez más simples, particularmente en lo que se refiere al uso de reguladores de crecimiento, haya sido propiciada por la aparición de múltiples y variados efectos tanto *in vitro* co-

mo *ex vitro* en los materiales reproducidos en presencia de altas concentraciones de reguladores de crecimiento. Pérez (1998) indica que en la década de los 80s la mayoría de los medios de cultivo para la multiplicación *in vitro* de plantas contenían concentraciones de BAP mayores a 5 mg l^{-1} .

Por otra parte, aunque lo deseable sería trabajar con niveles muy bajos de reguladores de crecimiento hay algunas especies que son difíciles de multiplicar *in vitro*, por lo que requieren de los reguladores de crecimiento en concentraciones variables y en forma independiente o en combinaciones, tal es el caso de *Dracaena deremensis* var. Janet Craig, donde se utilizan mezclas de auxinas y citoquininas para propiciar la multiplicación (Blanco *et al.* 2004). También en la micropropagación de algunas especies de *Philodendron*, para su multiplicación son necesarias concentraciones mayores a 5 mg l^{-1} de BAP, así como el apoyo de otra citoquinina y sustancias con efectos similares a los de este tipo de reguladores de crecimiento (Blanco y Valverde 2004).

La figura 6 muestra la proliferación de brotes, a las 4 semanas, a partir de una microestaca proveniente del desarrollo de un brote de la fase de establecimiento.

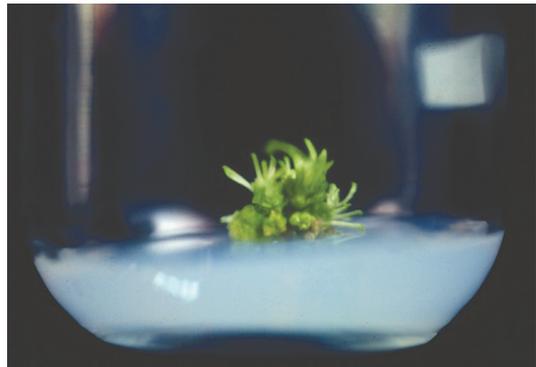


Fig. 6. Proliferación de brotes en la etapa de multiplicación de *E. purpurea*.

Enraizamiento

En el cuadro 1 se presenta el efecto de 1, 2 y 3 mg l^{-1} de AIA sobre la inducción de raíces a los 30 días de iniciada la prueba. El tratamiento

Cuadro 1. Producción de raíces y desarrollo de plántulas de *Echinacea purpurea* en un MS/50 suplementado con diferentes concentraciones de AIA.

AIA (mg l ⁻¹)	Plántulas > 2 cm de altura		Plántulas < 2 cm de altura	
	Raíces		Raíces	
	> 3cm	< 3 cm	> 3 cm	< 3 cm
1	37,50%	12,50%	6,25%	43,75%
2	28,50%	46,50%	0,00%	25,00%
3	45,00%	45,00%	10,00%	0,00%

con 3 mg l⁻¹ fue donde se obtuvo, no solo la mayor cantidad de plántulas con una altura >2 cm, con un 90%, sino que también la mayor cantidad de plántulas con raíces >3 cm. El mayor tamaño de las plántulas estaría asociado tanto a una mejor absorción de nutrimentos, por las raíces, como a una exploración y utilización más amplia del medio de cultivo, por las raíces más largas.

Con las concentraciones de 1 y 2 mg l⁻¹ de AIA, fue donde se obtuvo la mayor cantidad de plántulas <2 cm de altura, cuyas raíces fueron pequeñas en su mayoría. Cuando se obtuvo plántulas >2 cm, estas aunque alcanzaron la altura, su apariencia fue endeble y el sistema radical pobre. En otros trabajos con esta especie, se ha encontrado que el uso de auxinas no es necesario para promover el enraizamiento de los brotes (Harbage 2001).

El manejo de la concentración de sales minerales es recomendado ampliamente para estimular el enraizamiento (Murashige 1982, Lakshmi y Seeni 2003), lográndose la formación abundante de raíces al disminuir las sales a $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{3}$, ó $\frac{1}{4}$ de la concentración del medio, según la especie (Hu y Wang 1983, Zhao *et al.* 2003, Beena *et al.* 2003). Lakshmi y Seeni (2003), trabajando con *Calophyllum* - un árbol medicinal- encontraron que con una reducción de sales del medio de cultivo a la mitad y la adición de algunos reguladores de crecimiento, fue posible la inducción de raíces y una vez que las raíces fueron visibles, los brotes fueron transferidos a un medio de cultivo con $\frac{1}{4}$ de la concentración de las sales, para promover el crecimiento de las raíces. En nuestro caso la reducción de sales a

un 50% promovió un buen enraizamiento cuando el medio fue suplementado con 3 mg l⁻¹ de AIA (Figura 7).

Fig. 7. Plántulas de *E. purpurea* en la etapa de enraizamiento.

Aclimatización

Al final de 8 semanas en el invernadero, se obtuvo un 100% de sobrevivencia de las plántulas (Figura 8). Este resultado es atribuido a la combinación del sustrato, la alta humedad relativa dentro del túnel y las prácticas culturales realizadas. Donde, el sustrato de fibra de coco y suelo en proporción 1:1 presentó una alta retención de humedad, excelente drenaje, ausencia de



Fig. 8. Crecimiento de las plántulas de *E. purpurea* en el invernadero a las 4 semanas de aclimatización.

patógenos y lenta descomposición. Las raíces penetran mejor el sustrato, formando un mejor adobe, lo cual facilita su transporte y sobrevivencia. Por su parte, George (1996) indica que en el cultivo *in vitro*, por las características propias del sistema, las plántulas son básicamente heterotróficas y poseen cutículas sumamente delgadas. De allí que la confección de túneles con plástico transparente para su aclimatización, tiene como objetivo mantener una alta humedad relativa, que impida la deshidratación de las plántulas. También, el plástico transparente permite el paso de luz en una cantidad suficiente para que las plántulas empiecen a fotosintetizar. Las prácticas culturales permitieron una fertilización y protección adecuada de las plántulas.

En resumen, la mayor tasa de multiplicación, 12 brotes por explante cada 6 semanas, se obtuvo en un MS/50 con $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ de BAP. Se logró un 100% de enraizamiento cuando los brotes fueron subcultivados en el mismo medio de cultivo pero suplementado con 3 mg l^{-1} de AIA; además, la sobrevivencia de las plántulas, durante la aclimatización, fue del 100%.

AGRADECIMIENTO

Al Ministerio de Ciencia y Tecnología a través del Fondo de Incentivos por la ayuda económica recibida para la realización parcial de esta investigación.

LITERATURA CITADA

- BAUER R., WAGNER H. 1991. *Echinacea* species as potential immunostimulatory drugs. *Econ. Medicinal Plant Res.* 5:253-321.
- BAUER R., FOSTER S. 1991. Analysis of alkaloids and caffeic derivatives from *Echinacea simulata* and *E. paradoxa* roots. *Planta Medica* 57:447-449.
- BAUER R., KHAN I.A., WAGNER H. 1988. TLC and HPLC analysis of *Echinacea pallida* and *E. angustifolia* roots. *Planta Medica* 54:426-430.
- BEENA M.R., MARTIN K.P., KIRTI P.B., HARIHARAN M. 2003. Rapid *in vitro* propagation of medicinally important *Ceropegia candelabrum*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 72: 285-289.

- BLANCO M., VALVERDE R. 2004. Micropropagación de *Philodendron* sp. (posiblemente *P. corcovadense*). *Agronomía Costarricense* 28(1): 39-46.
- BLANCO M., VALVERDE R., GÓMEZ L. 2004. Micropropagación de *Dracaena deremensis*. *Agronomía Costarricense* 28(1): 7-15.
- BODINET C., BEUSCHER N. 1991. Antiviral and immunological activity of glycoproteins from *Echinacea purpurea* Radix. *Planta Medica* 57: 33-34.
- BODINET C., WILLIGMANN I., BEUSCHER N. 1993. Host-resistance increasing activity of root extracts from *Echinacea* species. *Planta Medica* 59:672-673.
- BONADEO I., BOTTAZI G., LAVAZZA M. 1971. Echinacin B: Active polysaccharide of the *Echinacea*. *Riv. Ital. Essenza. Profumi. PianteOoff.* 53:281-295.
- BUSING K. 1952. Hyaluronidasehemmung durch echinacin. *Arzneim Forsh.* 2:467-469.
- CROMBIE L., KRASINKI A. 1962. Synthesis of N-isobutylundeca-trans-2, cis-6, trans-8 and trans-2, cis-6, cis-8-trienamide. *Chemistry and Industry* 2:983-984.
- CHRIST B., MULLER K.H. 1960. Zur serienmabigen bestimmung dess gehaltes an flavonol-derivaten in drogen. *Arch. Pharm.* 293:1033-1042.
- DELABAYS N., SLACANIN I. 1995. Domestication and selection of new plant species of interest to the cosmetics industry. *Revue Suisse de Viticulture, d'Arboriculture et d'Horticulture* 27:143-147.
- DRAGLAND S., PAULSEN B.S., WOLD J.K., ROGNLIEN B. 1993. Medicinal plants-new material for Norwegian industry. *FAGINFO* 29,73.
- EVANS D.A., BRAVO J.E. 1985. Phenotypic and genotypic stability of tissue culture plants. *In: Tissue culture as a plant production system for horticultural crops.* R.H. Zimmerman (ed). p. 73-91.
- FAISAL M., ANIS M. 2003. Rapid mass propagation of *Tylophora indica* Merrill via leaf callus culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 75(2): 125-129.
- FELDMAN P., SAPOTILLE J., GREDOIRE P., ROTT P. 1994. Micropropagation of sugarcane. *In: In vitro culture of tropical plants.* Claude Teisson (ed.). CIRAD. p.15-17.
- FINNERTY T., ZAJICEK J.M. 1992. Effects of seed priming on plug production of *Coreopsis lanceolata* y *Echinacea purpurea*. *J. Environ. Hort.* 10:129-132.
- GALAMBOSI B., PALEVITCH D., SIMON J.E., MATHE A. 1992. Introduction of *Echinacea purpurea* and *Leuzea carthamoides* into cultivation in Finland. *Acta Hort.* 331:169-178.
- GEORGE E.F. 1996. Plant propagation by tissue culture. *In practice.* Exegetics. England. 1361.
- HARBAGE J.F. 2001. Micropropagation of *Echinacea angustifolia*, *E pallida*, and *E. purpurea* from stem and seed explants. *HortScience* 36(2):360-364.
- HILL N., C. STAM, van HASELEN R.A. 1996. The efficacy of prikweg R. gel in the treatment of insect bites: A double-blind, placebo controlled clinical trial. *Pharmacy World Sci.* 18:35-41.
- HOBBS C.R. 1989. *The Echinacea handbook.* Capitola: Botanica.
- HOBBS C.R. 1994. *Echinacea.* A literature review. *Herbalgram* 30:33-49.
- HU C.V., WANG J. 1983. Meristem, shoot tip and bud culture. *In: Handbook of Plant Cell.* D.A Evans, P.V. Ammirato, Y. Yameda (eds.). p. 256-290.
- JACOBSON M. 1954. Occurrence pungent insecticidal principles in american coneflowers roots. *Science* 120: 1028-1029.
- LAKSHMI N., SEENI S. 2003. *In vitro* multiplication of *Calophyllum apetalum* (Clusiaceae), an endemic medicinal tree of Western Ghats. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 75(2): 169-174.
- LORZ H., SCOWCROFT W.R. 1979. Variability among plants and their progeny regenerated from protoplast of *Nicotiana tabacum*, *Theor Appl Genet.* 66: 67-75.
- MARETSKI A., HIRAKI P. 1980. Sucrose promotion of roots formation in plantlets regeneration from callus of *Saccharum* spp. *Oyton* 38(1): 85-86.
- MEINS F. 1982. The nature of the cellular heritable change in cytokinin habituation. *In: Variability in plants regenerated from tissue culture.* Praeger. New York. p. 202-210.
- MROGINSKI L.A., ROCA W.M. 1991. Establecimiento de cultivos vegetales *in vitro*. *In: Cultivo de tejidos en la agricultura.* W.M. Roca y L.A. Mroginski (eds.). CIAT, Colombia. 969 p.
- MUNTEAN L., SALONTAI A., BOTEZ C., TAMAS M., CERNEA S., MORAR G., VAIDA F. 1992. Studies on methods of growing *Echinacea pallida* Nutt. *Buletinul Univ. De Stiinta Cluj Napoca Seria Agri. Sci. Hort.* 46:27-31.

- MURASHIGE T. 1982. Regeneration of plants. *California Agriculture* 36 (8): 19-20.
- PARMENTER G.A., BURTON L.C., LITTLEJOHN R.P. 1996. Chilling requirement of commercial *Echinacea* seeds. *N.Z.J. Crop Hort. Sci.* 24:109-114.
- PÉREZ P.J. (Ed.). 1998. Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas, Vol.1 (Cuba).
- PERRY N.B., van KLINK J.W., BURGESS E.J., PARMENTER G.A. 1997. Alkamides levels in *Echinacea purpurea* (L.) Moench: a rapid analytical method revealing differences among roots, rhizomes, stems, leaves, and flowers. *Planta Medica* 63:58-62.
- PORADA A.A., RAVINOVICH A.M. 1991. The flowering biology of *Echinacea purpurea* in the Polvata region. *Byulleten Glavnogo Botanicheskogo Sada.* 160:7-10.
- RAWLS R. 1996. Europe's strong herbal brew. *Chemical & Engineering News*, 23:53-60.
- SAMFIELD D.M., ZAJICEK J., COOB B.G. 1991. Rate and uniformity of herbaceous perennial seed germination and emergence as affected by priming. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 116:10-13.
- SCHULTE K.E., RUECKER G., PERLICK J. 1967. The presence of polyacetylene compounds in *Echinacea purpurea* and *E. angustifolia*. *Arzneim Forsch.* 17:825-829.
- SCHULTESS B.H., GIGER E., BAUMANN T.W. 1991. *Echinacea*: anatomy, phytochemical pattern, and germination of the achene. *Planta Medica* 57:384-388.
- SMITH-JOCHUM C.C., ALBRECHT M.L. 1987. Field establishment of three *Echinacea* species for commercial production. *Acta Hort.* 208:115-119.
- SMITH N. K. 1988. A review of factors influencing the genetic stability of micropropagated bananas. *Fruit* 43: 219-223.
- STARMAN T.W., CERNY T.A., M^cKENSIE A.J. 1995. Productivity and profitability of some field grown specialty cut flowers. *HortScience* 30:1217-1220.
- STOLL A., RENZ J., BRACK A. 1950. Antibacterial substances II. Isolation and constitution of echinacoside, a glycoside from the roots of *Echinacea angustifolia*. *Helv. Chim. Acta.* 33:1877-1893.
- VASIL I.K. 1984. Cell culture and somatic cell genetic of plants. vol 1. Laboratory procedures and their applications. Academic, Tokyo 657 p.
- VILLALOBOS I., ARIAS O. 1987a. Inducción y multiplicación de callos *in vitro* en tres cultivares comerciales de caña de azúcar (*Saccharum* spp.). *Agronomía Costarricense* 11(1): 39-44.
- VILLALOBOS I., ARIAS O. 1987b. Evaluación preliminar en el campo de plantas de caña de azúcar (*Saccharum* spp. cv. B-4362). *Agronomía Costarricense* 11(2):245-250.
- ZHAO D., WANG X., LU W., ZHENG G. 2003. Plant regeneration via organogenesis from adventitious bud explants of a medicinal herb species, *Polygonatum cyrtonema*. *In vitro Cell.Dev. Biol.-Plant* 39:24-27.
- ZINATI M. G., BRYAN H. H., LI Y. 2000. Enhancing germination of purple coneflower (*Echinacea angustifolia*) using stratification, salt priming, and biostimulants. *HortScience* 35(3): Abstracts 620.