

Evaluación de diferentes concentraciones de algunos reguladores de crecimiento en la multiplicación y enraizamiento *in vitro* de *Limonium* var. Misty blue

Evaluation of different concentrations of some plant growth regulators on *in vitro* multiplication and rooting of *Limonium* var. Misty blue

Albeiro Hernán Chamorro¹, Sonia Liceth Martínez², John Cristhian Fernández³ y Teresa Mosquera⁴

Resumen: Se evaluaron diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento en las fases de multiplicación y enraizamiento *in vitro* de *Limonium* var. Misty blue, las cuales son bajas en esta especie. Se trabajó con material *in vitro* donado por la Empresa La Plazoleta Ltda. Se evaluaron diferentes tipos y concentraciones de citoquininas (kinetina, KIN; 6-bencilaminopurina, BAP; y thidiazuron, TDZ) en la fase de multiplicación y dos tipos de auxinas (ácido indolacético, AIA; y ácido indolbutírico, AIB) a diferentes concentraciones en la fase de enraizamiento *in vitro*. En la fase de multiplicación los mejores resultados fueron obtenidos con el uso del medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con KIN o BAP a $0,5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ durante un período de cuatro (4) semanas. Se encontró que concentraciones altas de las citoquininas evaluadas en este trabajo inducen dediferenciación celular y reducen la tasa de multiplicación, especialmente el TDZ a $0,1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. En la fase de enraizamiento *in vitro* se obtuvieron buenos resultados manteniendo las plántulas por un período de tres (3) semanas en medio MS (1962) suplementado con AIB en concentraciones entre $0,5$ y $1,0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, lo cual consiguió un sistema radical adecuado para su posterior endurecimiento. En presencia de AIA no se formaron raíces en ninguna de las concentraciones evaluadas.

Palabras clave: sistema radical, citoquininas, auxinas, thidiazuron.

Abstract: This research was carried out in order to evaluate the effect of different concentrations of plant growth regulators on *in vitro* multiplication and rooting of *Limonium* var. Misty Blue, which are low in this specie. The plant material was provided by La Plazoleta Ltda Company. There were evaluated different types and concentrations of cytokinin (kinetin-KIN, benzylaminopurine-BAP, thidiazuron-TDZ) during the multiplication phase, as well as two types of auxins (indolacetic acid-IAA, and indolbutyric acid- IBA) at different concentrations during the *in vitro* rooting phase. In the multiplication period, the best results were obtained using the MS (Murashige y Skoog, 1962) supplemented with $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KIN or BAP for a period of four weeks. High concentrations of cytokinins induced cellular dedifferentiation and reduced multiplication rate, especially TDZ at $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. In the *in vitro* rooting phase, there were accomplished remarkable results when plantlets were kept on MS medium supplemented with IBA at $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ for three weeks, obtaining a root system, which was adequate for plant acclimatation. With the IAA, there was no root formation at any of the evaluated concentrations.

Key words: root system, cytokinin, auxin, thidiazuron.

Fecha de recepción: 6 de abril de 2005
Aceptado para publicación: 06 de junio de 2007

¹ Ingeniero agrónomo, Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. e-mail: albeiro_chamorro@yahoo.es

² Estudiante de Ingeniería Agronómica, Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. e-mail: slmartinezf@unal.edu.co

³ Estudiante de Maestría en Fisiología de Cultivos, Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. e-mail: jrfernandezl@unal.edu.co

⁴ Profesora asociada, Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. e-mail:tmosquerav@unal.edu.co

Introducción

LA INDUSTRIA DE LA FLORICULTURA es una de las más exitosas dentro del sector agropecuario colombiano y constituye una producción destinada a mercados extranjeros, especialmente a los Estados Unidos. Colombia es el segundo exportador mundial de flores frescas cortadas después de Holanda y el 86% de la producción tiene lugar en la Sabana de Bogotá (ASOCOLFLORES, 2004).

La tendencia actual de los mercados extranjeros es la compra de bouquets, mercado que día a día crece como estrategia para aumentar el consumo de flores durante el año (Pohmer, 2004). La combinación de especies y colores variados tiene aceptación en el mercado internacional y le da valor agregado al producto final, razón por la cual las empresas floricultoras requieren de varias especies, dentro de las cuales está *Limonium* var. *Misty blue*.

El género *Limonium* pertenece a la familia Plumbaginaceae y está representado por cerca de 300 especies, de las cuales aproximadamente 20 tienen fines comerciales (Barbieri *et al.*, 2000). *Limonium* 'Misty blue' pertenece a la serie *Misty*, que es un híbrido entre *L. latifolium* × *L. bellidifolium*; tiene un tallo prácticamente carente de hojas, con lo cual desaparece el olor característico del *L. latifolium* sin perder la altura y rigidez del *L. bellidifolium* (Lijalad, 1993). El *Limonium* es una flor que se usa sola o en combinación con otras para formar bouquets. Tiene gran duración en florero y las flores pasan del estado fresco al estado deshidratado con pequeños cambios en el color (Stephen *et al.*, 1986).

El uso de la micropropagación permite a los floricultores introducir rápidamente productos nuevos con una serie de ventajas tales como la propagación de material limpio, lo que hace que esta técnica presente grandes posibilidades de uso en la agricultura y, en especial, en la propagación masiva de plantas ornamentales (Boon, 1991). Así, como en el caso de otras especies ornamentales, la micropropagación de *Limonium* es una herramienta para obtener rápidamente grandes cantidades de material vegetal para el mercado.

La estrategia para obtener un producto vegetal *in vitro* óptimo depende de lograr un sistema que permita la selección de material en campo con excelentes condiciones agronómicas y, posteriormente, desarrollar un protocolo de laboratorio que en cada una de sus fases

—introducción, multiplicación, enraizamiento y endurecimiento—, conduzca a producir material vegetal de excelente calidad sanitaria, genética y fisiológica.

En el caso de la propagación de *Limonium* se establecieron inicialmente protocolos de propagación para *L. sinuatum* (Harazy, 1985), posteriormente aparecieron protocolos para algunos híbridos interespecíficos en *L. caspia*, *L. otolepis*, *L. dumosum* (Ruffoni y Mascarello, 2000).

Para algunos clones de *L. latifolium* se han reportado tasas de multiplicación altas con el uso de $1,0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ benciladenina (BA) y reduciendo la concentración de sacarosa a $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (Vitti, 2000 citado por Ruffoni y Mascarello, 2000).

En Colombia, la propagación de *Limonium* 'Misty blue' se hace a partir de la introducción al laboratorio de yemas florales, las cuales pasan por un proceso de desinfección, para luego obtener plántulas que serán la base para la multiplicación. La variedad presenta problemas para la multiplicación *in vitro* a causa de la utilización de protocolos para otros clones; por ejemplo, las tasas de multiplicación son bajas (1,5 brotes en cuatro semanas), lo que no permite disponer del volumen de plantas deseado en corto tiempo; además, presenta un bajo enraizamiento o en algunos casos no hay formación de raíces. En consecuencia, el objetivo de este trabajo fue evaluar diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento en la multiplicación y enraizamiento *in vitro* de *Limonium* 'Misty blue'.

Materiales y métodos

Materiales

Para esta investigación se trabajó con material *in vitro* de *Limonium* 'Misty blue' donadas por la Empresa La Plazoleta Ltda. Se utilizaron materiales, reactivos, equipos e instalaciones del Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de Colombia en Bogotá.

Metodología

Teniendo en cuenta que *Limonium* 'Misty blue' presenta baja tasa de multiplicación *in vitro* se diseñaron ensayos para evaluar el efecto de algunas citoquininas sobre la multiplicación. El material vegetal donado se cultivó en

medio sólido MS (Murashige y Skoog, 1962) durante tres semanas con el propósito de obtener plántulas para las pruebas posteriores. Los ensayos para multiplicación y enraizamiento se realizaron en medio MS con adición de $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de sacarosa, $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de inositol y $0,1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de tiamina, el pH se ajustó a 5,8. Las condiciones de cultivo en el cuarto de crecimiento fueron: fotoperiodo de 16 horas con luz blanca fría e intensidad de 4000 Lux, temperatura promedio de 20°C y humedad relativa promedio de 70%. El tiempo de evaluación para cada ciclo de multiplicación fue de cuatro semanas y para el de enraizamiento, tres.

Efecto de algunas citoquininas en la multiplicación de *Limonium var. Misty blue*

Se utilizó un diseño completamente aleatorio y la variable evaluada fue número de nudos a fin de calcular la tasa de multiplicación. Se establecieron diez repeticiones por tratamiento, cada unidad experimental consistió en un frasco de 125 mL con cinco propágulos, para un total de 50 propágulos por tratamiento. La tasa de multiplicación se calculó así:

$$\text{Tasa de multiplicación} = \frac{\text{número de nudos finales (cuatro semanas)}}{\text{número de nudos iniciales}}$$

Efecto independiente de thidiazuron, benzilaminopurina y kinetina sobre la multiplicación

Las citoquininas thidiazuron (TDZ), benzilaminopurina (BAP) y kinetina (KIN) han sido reportadas como fuertes inductores de brotes (Huetteman y Preece, 1993; Krikorian, 1995; Ruffoni y Mascarello, 2000). En este sentido, se evaluaron los reguladores de crecimiento TDZ a concentraciones de $0,01$, $0,05$ y $0,1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, BAP a $0,5$, $1,0$ y $2,0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ y KIN a $0,5$, $1,0$ y $2,0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Con base en información previa de micropropagación habitual de *Limonium* 'Misty blue' en Colombia, se utilizó el tratamiento con BAP a $1,0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ como testigo relativo.

Debido a que a nivel comercial la producción *in vitro* de *Limonium* 'Misty blue' no se mantiene de forma constante, los tratamientos se evaluaron por varios ciclos de cultivo para observar su comportamiento en el tiempo como respuesta a los tratamientos planteados. Para los ensayos con TDZ, BAP y KIN se realizaron tres subcultivos consecutivos cada cuatro semanas.

Efecto de la interacción de kinetina y ácido indol-acético sobre la multiplicación

Con el propósito de evaluar la interacción de una citoquinina con una auxina para promover la formación de nudos y la elongación de propágulos, se evaluó KIN a concentraciones de $0,5$, $1,0$ y $2,0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ en interacción con AIA a concentraciones de $0,01$ y $0,05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ para un total de seis (6) tratamientos. Este ensayo tuvo dos ciclos consecutivos con una duración de cuatro semanas cada uno.

Efecto independiente de dos auxinas en el enraizamiento

Se evaluaron los reguladores de crecimiento ácido indolacético (AIA) a concentraciones de $0,05$, $0,1$, $0,5$ y $1,0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ y ácido indolbutírico (AIB) a concentraciones de $0,5$, $1,0$, $2,0$ y $3,0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. El testigo fue el tratamiento libre de reguladores de crecimiento. Se realizaron cinco repeticiones por tratamiento, cada unidad experimental con tres propágulos, para un total de 15 propágulos por tratamiento. El material se incubó en cuarto de crecimiento durante tres semanas.

Resultados

Efecto del thidiazuron sobre la brotación

Con la concentración de $0,01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de TDZ se obtuvo una tasa de multiplicación de 2,6 en un periodo de cuatro semanas siendo la tasa de multiplicación más alta en este regulador (tabla 1). Los tratamientos en los cuales se evaluaron concentraciones de $0,05$ y $0,1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ presentaron tasas de multiplicación menores que oscilaron entre 1,1 y 1,8.

Se utilizaron diez (10) réplicas por tratamiento para un total de 50 propágulos por tratamiento. En la tabla 1, los valores de las columnas 6, 7 y 9 son los valores promedio de cada tratamiento y los valores de las columnas 8 y 10 son los promedios acumulados de los ciclos 1-2 y 1-2-3, respectivamente (tabla 1).

La concentración más alta de TDZ evaluada en este trabajo ($0,1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) presentó las tasas de multiplicación más bajas, de 1,5 en el primer ciclo y 1,1 en el tercer ciclo. En esta concentración ($0,1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) se observó una fuerte tendencia de los tejidos a la desdiferenciación y a formar callo en la base del propágulo (figura 1a).

Tabla 1. Tasa de multiplicación obtenida con thidiazuron (TDZ), 6-bencilaminopurina (BAP), kinetina (KIN) y ácido indolacético (AIA) a diferentes concentraciones en *Limonium* ‘Misty blue’. Cada ciclo corresponde a un periodo de cuatro semanas.

TDZ mg · L ⁻¹	BAP mg · L ⁻¹	KIN mg · L ⁻¹	AIA mg · L ⁻¹	Tratamiento	Tasa de multiplicación en cada ciclo				
					1	2	Promedio (1,2)	3	Promedio (1,2,3)
0,01				1	2,6	2,4	2,50	2,4	2,47
0,05				2	1,8	1,7	1,75	1,4	1,63
0,1				3	1,5	1,2	1,35	1,1	1,27
	0,5			4	2,8	3,1	2,95	2,9	2,93
	1,0 ^{TR}			5	2,5	2,2	2,35	2,4	2,37
	2,0			6	1,9	1,9	1,90	1,9	1,90
		0,5		7	2,2	2,3	2,25	2,2	2,23
		1,0		8	2,5	2,3	2,40	2,5	2,43
		2,0		9	2,6	2,7	2,65	2,7	2,67
		0,5	0,01	10	2,2	2,2	2,20		
		0,5	0,05	11	2,4	2,3	2,35		
		1,0	0,01	12	2,5	2,5	2,50		
		1,0	0,05	13	2,3	2,4	2,35		
		2,0	0,01	14	2,4	2,6	2,50		
		2,0	0,05	15	2,4	2,6	2,50		



Figura 1. Efecto de TDZ, KIN y BAP en la multiplicación *in vitro* de *Limonium* ‘Misty blue’: a) 0,1 mg · L⁻¹ TDZ; b) 0,5 mg · L⁻¹ KIN; c) 0,5 mg · L⁻¹ BAP.

Efecto de la kinetina sobre la multiplicación

A medida que aumenta la concentración de KIN, la tasa de multiplicación se incrementa (tabla 1) pero el vigor de los brotes disminuye. Los brotes que muestran mejor calidad en su forma y tamaño de hoja corresponden al tratamiento con la concentración más baja de kinetina evaluada: 0,5 mg · L⁻¹ (figura 1b). A través del tiempo dentro de este mismo tratamiento no se observó tendencia en el cambio de esta tasa de multiplicación.

En concentración de 2,0 mg · L⁻¹ de KIN durante los tres ciclos se obtuvo una tasa de multiplicación entre 2,6 y 2,7 de forma constante (tabla 1), no se presentó disminución en la brotación a través del tiempo y el vigor de los brotes también se mantuvo constante.

Efecto de la benzilaminopurina sobre la multiplicación

En la concentración de 0,5 mg · L⁻¹ de BAP se presentó la tasa de multiplicación más alta (tabla 1). En esta concentración la tasa de multiplicación en el primer ciclo fue 2,8, en el segundo 3,1 y en el tercero 2,9. Los brotes mostraron buen tamaño de hojas, coloración más verde y brotes mejor formados con respecto a las concentraciones más altas evaluadas de este regulador (figura 1c).

Al aumentar la concentración de BAP disminuyó la tasa de multiplicación (tabla 1) y la calidad. Con 2,0 mg · L⁻¹ de BAP la tasa de multiplicación es de 1,9 para cada ciclo de cultivo. A través del tiempo dentro de la misma concentración, la tasa de multiplicación se mantiene constante, pero se observa proliferación de brotes pequeños que no llegan a diferenciarse completamente.

Efecto de la interacción de kinetina y ácido indolacético sobre la multiplicación

Los tratamientos 12, 14 y 15 obtuvieron tasas de multiplicación promedio de 2,5 (tabla 1) lo que es inferior a los valores obtenidos con las citoquininas evaluadas individualmente. A través del tiempo no hubo variaciones evidentes en la tasa de multiplicación, lo que indica que este material vegetal responde de manera constante a la aplicación exógena de estos dos reguladores.

Efecto de los ácidos indolbutírico e indolacético en la formación de raíces *in vitro*

El efecto del ácido indolbutírico (AIB) sobre el número de raíces fue directamente proporcional a la concentración del regulador (tabla 2). A $0,5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de AIB se observó el desarrollo de 21 raíces en promedio por brote, mientras que a $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de AIB se desarrollaron 52 raíces promedio por brote, con valores intermedios de 28 y 35 a 1 y $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, respectivamente. El ácido indolacético (AIA) no tuvo efecto sobre el número de raíces.

El efecto de AIB sobre la longitud de raíces fue inversamente proporcional a la concentración del regulador (tabla 2). A $0,5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de AIB la longitud promedio de las raíces fue de 12 mm, mientras que a $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ la longitud fue de 3mm, con valores intermedios de 6 y 3 a 1 y $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ respectivamente. AIA no tuvo efecto en la longitud de las raíces.

Tabla 2. Efecto de AIB y AIA en el enraizamiento *in vitro* de *Limonium* 'Misty blue'. Se utilizaron diez (10) réplicas por tratamiento para un total de 50 propágulos por tratamiento. Los datos corresponden al valor promedio en la tercera semana después de la siembra.

AIB($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	AIA($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	Tratamiento	No. Raíces	Longitud de raíz
0,0	0,0	1	0	0
0,5		2	21	12
1,0		3	28	6
2,0		4	35	3
3,0		5	52	3
	0,05	6	0	0
	0,1	7	0	0
	0,5	8	0	0
	1,0	9	0	0

Discusión

La tasa de multiplicación de brotes se puede optimizar sustancialmente con la adición en el medio nutritivo de concentraciones apropiadas de citoquininas con o sin una auxina (Bhojwani y Razdan, 1996).

Las citoquininas generalmente se utilizan en bajas concentraciones para estimular la proliferación de tejidos y en concentraciones más elevadas para desencadenar la neoformación de yemas sobre callos (Margara, 1988). Las citoquininas más usadas comúnmente son las purinas substituidas (KIN y BAP), aunque algunas ureas substituidas como el TDZ, también tienen actividad como citoquinina, la mayor propiedad de estas citoquininas es estimular la división celular (Krikorian, 1995). Las citoquininas son capaces de estimular la síntesis de ARN y proteínas (Weaver, 1982). Al parecer, en cultivo de tejidos, las citoquininas actúan incrementando la rapidez de la síntesis de proteínas, algunas de las cuales podrían ser enzimas o proteínas estructurales necesarias para la mitosis (Salisbury y Ross, 1994).

En la presente investigación, se obtuvieron tasas de multiplicación apropiadas para *Limonium* 'Misty blue', especialmente a $0,5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de BAP y KIN en medio MS suplementado con 3% de sacarosa. De manera similar, Sydney *et al.* (2000) observaron los mejores resultados en la multiplicación de *Limonium latifolium* (Kuntze) a $0,7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de BAP en medio MS. Xiao y Kozai, (2006) reportaron que $0,25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de BAP en medio MS sin azúcar, y utilizando un material poroso de soporte (florialite), produjo resultados óptimos y comparables con un medio suplementado con sacarosa 3% y solidificado con agar en la multiplicación de *Limonium latifolium*, lo que sugiere posibles alternativas a los resultados del presente estudio.

Los valores de la tasa de multiplicación entre TDZ ($0,01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), KIN ($0,5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) y BAP ($0,5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) fueron cercanos, fenómeno que también se observó en *Limonium cavanillesii* (Erben) cuya tasa de multiplicación tuvo los valores más altos al utilizar KIN (2 a $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), BAP ($0,1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) y TDZ ($5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) sin diferencias significativas entre ellos (Amo e Ibáñez 1998). Sin embargo, los resultados en *Limonium* 'Misty blue' indican que a través del tiempo hay variación cualitativa en respuesta a TDZ y BAP y variación cuantitativa en respuesta a TDZ. Barlow (1987), citado por Garcidueñas y Ramírez (1993), afirma que en ocasiones diversas hormonas

determinan efectos similares, pero hay momentos del desarrollo en la que sobre sus propiedades comunes cada hormona suscita una respuesta específica.

La combinación de AIA y KIN a las diferentes concentraciones utilizadas en este estudio, presentaron resultados similares e incluso inferiores a los obtenidos con la utilización de citoquininas únicamente. Esto sugiere que el balance hormonal de *Limonium* 'Misty blue' en la fase de multiplicación no hace necesaria la adición de auxinas. En contraste, Huang *et al.* (2000) obtuvieron resultados óptimos en la multiplicación de brotes adventicios de *Limonium wrightii* (Hance) Ktze con $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de BA más $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de ANA en medio MS suplementado con sacarosa 3%.

Los resultados obtenidos en esta investigación muestran que las concentraciones más bajas de las citoquininas usadas son más eficientes en la proliferación de brotes en *Limonium* 'Misty blue'; el aumento en la concentración conduce a desdiferenciación de los brotes y pérdida de la calidad. Es posible que se acelere el proceso de división celular (mitosis), lo que conduce a la inducción de callo y, por lo tanto, se reduce la tasa de multiplicación como consecuencia de la desdiferenciación. Esto es más evidente en TDZ ($0,1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) que en BAP ($2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) y KIN ($2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$). Según Mok *et al.* (1982) citados por Huetteman y Preece (1993), el TDZ es la más potente de las fenilureas: usado en cultivo de tejidos vegetales tiene alta acción citoquinina con respecto a las citoquininas convencionales como la zeatina (ZEA), BAP y KIN. Según Victor *et al.* (1999), el modo de acción del TDZ puede ser atribuido a la capacidad de inducir acumulación de citoquininas y aumentar la acumulación y traslocación de auxinas dentro de tejidos expuestos a TDZ (Murch y Saxena., 2001).

Prathanturarug *et al.* (2003) reportaron que la exposición de explantes a altas concentraciones de citoquininas como KIN, BAP, 2-ip y TDZ disminuye el incremento en la proliferación de brotes en *Curcuma longa*, de manera similar; las más altas concentraciones usadas en el presente estudio, en donde BAP y especialmente de TDZ produjeron menores tasas de multiplicación, tendencia a desdiferenciación y formación de callosidades.

Según Kim *et al.* (1997); Chand *et al.* (1999), altos niveles de TDZ causan anomalías o son tóxicos. Adicionalmente, otros estudios reportan resultados similares, Olivera *et al.* (2000) quienes trabajaron con KIN,

BA y TDZ en *Gerbera jamesoni*, observaron que los brotes obtenidos con KIN presentaron buen aspecto y tamaño, en tanto que, en los tratados con BA y TDZ el desarrollo fue menor; además, los tratamientos con TDZ indujeron formación de callo y deformación de brotes.

El efecto de TDZ, sobre los propágulos de *Limonium* 'Misty blue' que fueron sometidos a varios subcultivos consecutivos, redujo la tasa de multiplicación a través del tiempo. La alta resistencia a la degradación que tiene el TDZ por acción de la enzima citoquinina oxidasa (Mok *et al.*, 1987 citado por Cruz *et al.*, 2003), puede inactivar o limitar las respuestas de las citoquininas (Kaminek y Armstrog, 1990 citados por Cruz *et al.*, 2003), esto sugiere que la acción citoquinina de TDZ disminuye con el tiempo lo que se vio reflejado en esta investigación.

En el enraizamiento *in vitro* de *Limonium* 'Misty blue' se evidenció claramente que la auxina que permite formación de raíces es AIB, mientras que AIA no induce raíces en este material. La concentración de $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de AIB indujo un promedio de 52 raíces por brote en un periodo de tres semanas, pero con una longitud de 3 mm en promedio por planta. En contraste, a $0,5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de AIB la longitud promedio de raíces por planta fue de 12 mm con 26 raíces por planta. Asociando longitud y número de raíces, las concentraciones posibles de AIB para la fase de enraizamiento de *Limonium* 'Misty blue' oscilan entre $0,5$ y $1,0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ lo que garantiza entre 21 y 28 raíces por brote con una longitud entre 6 y 12 mm. Estas concentraciones son acordes a las encontradas en investigaciones con plantas cercanas. Sydney *et al.* (2000) determinaron que $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de AIB es apropiado para la fase de enraizamiento *in vitro* de *Limonium latifolium* (KUNTZE) y (Huang *et al.* (2000) reportaron en *Limonium wrightii* (Hance) Ktze, que el enraizamiento *in vitro* de brotes adventicios se logró exitosamente con AIB a $1,2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

Según los resultados obtenidos en esta investigación, para el manejo comercial de la multiplicación *in vitro* de *Limonium* 'Misty blue' se recomienda BAP o KIN a $0,5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ cada una. El BAP ofrece una tasa de multiplicación que oscila entre 2,8 y 3,1 y la KIN entre 2,2 y 2,3 en un periodo de cuatro semanas. La calidad de los propágulos es mejor con KIN que con BAP. Para el enraizamiento *in vitro* la mejor opción es utilizar AIB en concentraciones entre $0,5$ y $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Con esto se pueden tener brotes de *Limonium* 'Misty blue' con un sistema radical adecuado para adaptación.

Agradecimientos

Los autores expresan sus agradecimientos a la Empresa La Plazoleta Ltda., por la donación del material vegetal para llevar a cabo esta investigación.

Literatura citada

- Amo, J. y M. Ibáñez, 1998. Micropropagation of *Limonium cavanillesii* Erben, a threatened static, from inflorescence stems. *Plant Growth Regulat.* 24, 49-54.
- ASOCOLFLORES. Estadísticas. 2004. En: <http://www.asocolflores.org/info/info.php>; consulta: marzo 2005.
- Barbieri, G., S. De Pascale, R. Paradiso, E. Farina, C. Dalla Guda, C. Cervelli y E. Scordo. 2000. Tecniche di produzione e coltivazione dei *Limonium* ornamentali speciale *Limonium*. *Flortecnica* 5, 89-96.
- Bhojwani, S. y M. Razdan. 1996. *Plant tissue culture: Theory and practice*, a revised edition. Elsevier, Amsterdam. 766 p.
- Boon, H. 1991. Escenario global de la floricultura para el año 2000. *Revista Asocolflores* 28, 7-9.
- Chand, H. M. Pearson y P. Lovell. 1999. Rapid vegetative multiplication in *Colocasia esculenta* (L) Schott (taro). *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 55, 223-226.
- Cruz, I. A. Angarita y T. Mosquera. 2003. Inducción de embriogénesis somática en *Alstroemeria spp.* *Agron. Colomb.* 21(3), 121-128.
- Garcidueñas, M. y H. Ramírez, 1993. Control hormonal del desarrollo de la planta: fisiología, tecnología y experimentación. Segunda edición. Editorial Limusa, México D.F. 53 p.
- Harazy, A., B. Leshem, A. Cohem. 1985. *In vitro* propagation of *Stachys* as an aid breeding. *HortScience* 20 (3), 361-362.
- Huang, C., M. Hsieh, W. Hsieh, A. Sagare, H. Tsay. 2000. *In vitro* propagation of *Limonium wrightii* (Hance) Ktze. (Plumbaginaceae), an ethnomedicinal plant, from shoot-tip, leaf and inflorescence-node explants. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 36, 220-224.
- Huetteman, C. y Preece, J. 1993. Thidiazuron, a potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 33, 105-119.
- Kim, M., H. Sommer, B. Bongarten y S. Merkel. 1997. High frequency induction of adventitious shoots from hypocotyl segments of *Liquidambar styraciflua* L. by thidiazuron. *Plant Cell Rpt.* 16, 536-540.
- Krikorian, A.D. 1995. Hormones in tissue culture and micropropagation. En: *Plant hormones physiology, biochemistry and molecular biology*. Kluwer Academic Publishers. Dordrech, Boston, London. pp. 774-79.
- Lijalad, C. 1993. *Limonium*. En: *Hortalizas, flores y plantas ornamentales*. Ediciones de Horticultura 84, pp. 29-35.
- Margara, J. 1988. Multiplicación vegetativa y cultivo *in vitro*. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid. pp. 27-30, 71-118.
- Murashige, T. y F. Skoog, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. *Physiol. Plant* 15, 473-479.
- Murch, S. y P. Saxena. 2001. Molecular fate of thidiazuron and its effects on auxin transport in hypocotyls tissues of *Pelargonium X hortorum* Bailey. *Plant Growth Regulat.* 35, 269-275.
- Olivera, V., M. Gutiérrez, J. Gutiérrez y M. Andrade. 2000. Cultivo *in vitro* de *Gerbera (Gerbera jamesonii* H. Bolus) y su aclimatación en invernadero. *Bioagro* 12(3), 75-80.
- Pohmer, S. 2004. Bouquets colombianos conquistan a Estados Unidos. En: *Información Preferencial Flores*, (septiembre 14), pp. 6-7.
- Prathanturarug, S., N. Soonthornchareonnon, W. Chuakul, Y. Phaidee, B. Ruffoni y C. Mascarello. 2000. La propagazione dei *Limonium ornamentali* speciale *Limonium*. *Flortecnica* 5, 101-110.
- Ruffoni B. y C. Mascarello. 2000. Germinazione *in vivo* e *in vitro* del seme di *Limonium*. *Flortecnica* 5, 28-30.
- Salisbury, F. y C. Ross, 1994. *Fisiología vegetal*. Grupo Editorial Iberoamerica S.A., México D.F. 759 p.
- Stephen, M., R. Butcher, J. Bicknell, F. Seelye y K. Borst. 1986. Propagation of *Limonium peregrinum*. The International Plant Propagators Society (Combined proceedings of annual meetings) 3, 448-450.
- Sydney, C., L. Rodrigues y A. Kämpf. 2000. *In vitro* propagation of *Limonium latifolium* Kuntze (*Plumbaginaceae*). *Cienc. Rural.* 30, 4.
- Victor, J., B. Murthy, S. Murch, S. Krishnaraj y P. Saxena. 1999. Role of endogenous purine metabolism in thidiazuron induced somatic embryogenesis of peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant Growth Regul.* 28, 41-47.
- Weaver, R. 1982. Reguladores de crecimiento de las plantas en la agricultura. Editorial Trillas, México D.F. 622 p.
- Xiao, Y. y T. Kozai, 2006. *In vitro* multiplication of static plantlets using sugar-free media. *Scientia Hort.* 109, 71-77.