

## ***Effect of concentration of IBA during rooting phase in vitro of Limonium sinuatum on the survival and quality of the plant***

**J. Sánchez<sup>(1,2)</sup>, A.A. Calderón<sup>(1)</sup>**

<sup>(1)</sup> Departamento de Ciencia y Tecnología Agraria. Área de Fisiología Vegetal. Universidad Politécnica de Cartagena. España.

<sup>(2)</sup> Barberet & Blanc, S.A. Puerto Lumbreras, Murcia. España. E-mail: [jesus.tecnologia@hotmail.com](mailto:jesus.tecnologia@hotmail.com)

### **Resumen**

La fase de enraizamiento en el cultivo *in vitro* de *Limonium sinuatum* es fundamental por la selección del tipo y concentración de auxina utilizada en el medio de cultivo. Estos dos aspectos tienen consecuencias sobre el rendimiento del proceso, número de plantas aclimatadas, la producción y calidad de las plantas. Este trabajo muestra los resultados del ensayo diseñado para estudiar el comportamiento de cuatro variedades de limonio de distintos colores, Sn09P1, Sn301, Sn349 y Sn08P5, cultivadas en medio Murashige and Skoog (MS) suplementado con diferentes concentraciones de ácido indol-3-butírico (IBA) para estimular el enraizamiento. Entre las determinaciones realizadas, se tomaron medidas del porcentaje de esquejes enraizados y del porcentaje de plantas supervivientes en la fase de aclimatación. También se midió la producción, la longitud del tallo, número de espigas por tallo y número de ramificaciones por tallo durante la fase de cultivo en invernadero. Los resultados obtenidos muestran que el efecto que produce la concentración de IBA depende de la variedad estudiada, de manera que para cada una de ellas es posible ajustar aquella concentración que da mayores porcentajes de enraizamiento y supervivencia sin perjudicar a la producción ni a los valores requeridos en los parámetros de calidad estudiados.

**Palabras clave:** limonio; auxina; aclimatación; producción.

### **Abstract**

The rooting phase in the cultivation *in vitro* of *Limonium sinuatum* is one of the most important steps in the whole process. For this reason it is crucial to select the proper type and concentration of the auxin for its use in culture medium. These two aspects have an impact on process performance, the number of acclimated plants, production and quality of cultivated plants. In this work the results of conducted study of the behavior of four varieties of different colors, "Sn09P1", "Sn301", "Sn349" and "Sn08P5", and cultivated in Murashige Skoog (MS) medium with different concentrations of indole-3-butyric acid (IBA) are described. Determination of both the percentage of rooted cuttings and the percentage of surviving plants in the acclimation phase were carried out. Other parameters determinate were the plant's overall production, the length of the stem, number of ears per stem and number of branches per stem during the greenhouse cultivation. The effect produced by the concentration of IBA depends on the studied range so that each of them has been able to adjust to that concentration which gives higher percentages of rooting and survival without impairing the production values or parameters required quality studies.

**Keywords:** statice; auxin; acclimation; production.

### **1. Introducción**

*Limonium sinuatum* es una especie de la familia de las Plumbagináceas. Esta planta es muy valorada por el mercado que tiene tanto para flor seca como para flor en fresco.

Esta especie presenta un problema respecto a la propagación masiva de plantas. La producción de *Limonium* se realiza por semilla o esqueje, de forma que para obtener una planta se necesitan entre 6 y 8 meses, con rendimientos bajos (20-30%) y en muchas ocasiones las plantas no presentan homogeneidad. Como alternativa se suele utilizar la propagación *in vitro* o micropropagación, que se realiza en laboratorio

bajo condiciones controladas. Aunque ofrece grandes ventajas, para poder utilizar este método es necesario resolver algunos problemas que pueden limitar los rendimientos. Además, la explotación comercial de estas técnicas requiere la optimización de una serie de parámetros que, en la mayor parte de los casos, debe hacerse cultivar por cultivar. Entre los factores que se deben tener en cuenta se incluyen el método de establecimiento [1,2], la elección del método de cultivo, el ajuste de los medios de cultivo (nutrientes y hormonas) [3,4], la posible aparición de hiperhidricidad, etc.

La empresa Barberet & Blanc, S.A., situada en Puerto Lumbreras (Murcia), se dedica, entre

otras actividades, a la mejora genética y a la obtención de nuevas variedades de *Limonium sinuatum*. Una parte importante de su esquema productivo está basado en el cultivo *in vitro* de la especie, por lo que es necesario depurar la técnica de micropropagación en todas las fases que comprende el proceso con el fin de conseguir suficientes plantas con la calidad apropiada para obtener la máxima rentabilidad.

En este trabajo se describe el ensayo realizado con cuatro variedades de limonio de diferentes colores, Sn09P1 (rosa fuerte), Sn301 (violeta), Sn349 (amarillo) y Sn08P5 (rosa claro), durante la fase de enraizamiento *in vitro*, con el objetivo de conocer el efecto que produce la concentración de IBA sobre la fase de enraizamiento, aclimatación y cultivo. Esto es importante, ya que uno de los problemas habituales con esta especie es la baja tasa de enraizamiento. Por otro lado, también se evaluó efecto de los tratamientos sobre la supervivencia tras la aclimatación y durante la fase de cultivo de estas variedades. El fin último es conseguir altos porcentajes en las dos primeras fases (> 85%), obteniendo valores altos en los parámetros de producción y de calidad durante el cultivo.

## 2. Materiales y Métodos

### 2.1 Material vegetal y condiciones de cultivo

Para realizar este ensayo se utilizaron plantas multiplicadas en cultivo *in vitro* de *Limonium sinuatum* de las variedades Sn09P1, Sn301, Sn349 y Sn08P5 que estaban en la fase de enraizamiento.

En esta fase de enraizamiento se utilizó un medio de cultivo con la concentración de macro- y micronutrientes descrita por Murashige y Skoog (1962) [5] y suplementado con un 3 % (p/v) de sacarosa, y diferentes concentraciones de ácido indol-3-butírico (IBA). Posteriormente, el pH de los medios se ajustó a 5,8 y se añadió agar a una concentración del 0,9 % (p/v). El medio se distribuyó en tubos de ensayos y éstos se autoclavaron a 104 KPa y a 121 °C durante 20 min. Todos los cultivos se mantuvieron a 23°C y un fotoperiodo de 16 h.

### 2.2 Tratamientos

Para estudiar el efecto de la concentración de IBA se establecieron tres tratamientos para cada una de las variedades. En el tratamiento 1 (T-1) el medio de cultivo tenía una concentración de 1 mg/L (control), el tratamiento 2 (T-2) tenía 3 mg/L de IBA en el medio de cultivo y el tratamiento 3 (T-3) llevaba 5 mg/L de IBA.

### 2.3 Diseño y análisis estadístico

En este ensayo se cultivaron 20 plantas por variedad y tratamiento. Se realizaron tres repeticiones. La duración de las fases de enraizamiento, de aclimatación y de cultivo fue de 35 días, de 45 días y de 5 meses, respectivamente. En la fase de enraizamiento se tomaron medidas del porcentaje de esquejes enraizados a los 20 y 35 días. En fase de aclimatación se anotaron datos del porcentaje de plantas supervivientes. Durante la fase de cultivo se tomaron medidas sobre la producción (tallos/planta), longitud del tallo (cm), número de espigas por tallo y nº de ramificaciones por tallo, determinando así la calidad agronómica y comercial. Todos los datos recogidos fueron estudiados con un análisis de la varianza (ANOVA).

## 3. Resultados y Discusión

### 3.1 Enraizamiento y aclimatación

El porcentaje de esquejes enraizados y de plantas aclimatadas para la variedad Sn09P1 fue del 100% para todos los tratamientos (Tabla 1). Para la variedad Sn301 el número de esquejes que presentaron raíces aumentó de forma significativa a medida que aumentó la concentración de IBA en el medio, pasando de un 12% para el T-1, a un 71% y a un 87% para T-2 y T-3, respectivamente (Tabla 2). Sucedió lo mismo en esta variedad para el porcentaje de plantas aclimatadas. En cuanto a Sn349 se observó que los porcentajes de esquejes enraizados fueron altos (Tabla 3), sin embargo si se vieron diferencias significativas respecto al porcentaje de plantas supervivientes después de la aclimatación, mostrando el valor más alto el tratamiento el T-3. Respecto al comportamiento de la variedad Sn08P5, se puede ver que el porcentaje de esquejes aumentó al aumentar la concentración de hormona en el medio, llegando al 100% en T-2 y T-3, sin embargo se observó una bajada en cuanto al porcentaje de plantas aclimatadas a subir la concentración de auxina en el medio, bajando incluso hasta el 70% en el T-3 (Tabla 4).

### 3.2 Producción y parámetros de calidad

La producción en todas las variedades ensayadas no presentó diferencias significativas entre los tratamientos realizados (Fig.1). El T-2 mostró producciones más altas, excepto en Sn08P5, donde el T-1 fue el tratamiento con mayor producción. En cuanto a la longitud del tallo, se puede apreciar en la Fig. 2 que el T-1 fue el que presentó los tallos más largos, y solamente en la

variedad Sn09P1 se observaron diferencias significativas entre tratamientos. También se observó que para Sn301 el T-3 mostró una longitud de tallo por debajo de la requerida (60 cm) para ser considerado de calidad extra (Fig. 2). Con respecto al número de espigas por tallo (Fig. 3), el comportamiento dependió de la variedad, pero este parámetro se encontró siempre por encima del mínimo requerido (6 espigas/tallo). Solamente Sn301 en el T-2 presentó un valor bajo, mostrando además diferencias significativas con los otros tratamientos. En las demás variedades no hay diferencias significativas entre tratamientos para este parámetro. El número de ramificaciones por tallo debe estar por encima de 3, y se puede observar en la Fig. 4 que para todas variedades se obtuvo este valor, y no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos.

#### 4. Conclusiones

En la variedad Sn09P1 se aprecian buenos porcentajes de enraizamiento y aclimatación con independencia del tratamiento utilizado. Por otro lado, debido a que la longitud del tallo es mayor en el tratamiento de 1 mg/L de IBA, se considera continuar con este tratamiento para esta variedad.

Para la variedad de color violeta Sn301, los porcentajes de enraizamiento y aclimatación mejoran para los tratamientos T-2 y T-3 con respecto al control. Sin embargo, debido a la disminución en la longitud del tallo en el tratamiento T-3, se considera mejor el T-2 de 3 mg/L de IBA.

En la variedad Sn349, de color amarillo, se mejora el porcentaje de plantas con raíces y aclimatadas al aumentar la concentración de IBA. Por otro lado, en medios con la concentración de 5 mg/L de IBA (T-3) se aprecia una bajada en la producción. Por tanto, para esta variedad se considera que se puede utilizar el tratamiento T-2.

Para la variedad Sn08P5, los porcentajes de enraizamiento aumentan y los de aclimatación disminuyen al aumentar las concentraciones de IBA. Además, como en ninguno de los parámetros de calidad estudiados se aprecian diferencias significativas, se considera conveniente continuar con el tratamiento T-1 (control).

#### 5. Agradecimientos

Este trabajo está siendo apoyado y financiado por la empresa Barberet & Blanc, S.A. Algunos de los ensayos han sido llevados a cabo en las instalaciones del Instituto de Biotecnología Vegetal de la UPCT.

#### 6. Referencias bibliográficas

- [1] Igawa, T., Hoshino, Y. & Mii, M. 2002. Efficient plant regeneration from cell cultures of ornamental statice, *Limonium sinuatum* Mill. In Vitro Cell Dev-Pl. 38: 157-162.
- [2] Jeong, J.H., Murthy, H.N. & Paek, K. 2001. High frequency adventitious shoot induction and plant regeneration from leaves of statice. Plant Cell Tiss. Org. 65: 123-128.
- [3] Xiao, Y. & Kozai, T. 2006. In vitro multiplication of statice plantlets using sugar-free media. Sci. Hort-Amsterdam. 109: 71-77.
- [4] Chamorro, A., Martínez, S., Fernández, J.C., & Mosquera, T. 2007. Evaluation of different concentrations of some plant regulators on *in vitro* multiplication and rooting of *Limonium* var. Misty Blue. Agron. Colomb. 25: 47-53.
- [5] Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plantarum 15: 473-497.

#### Tablas y Figuras

**Tabla 1.** Enraizamiento y aclimatación de Sn09P1

Ensayo	Esquejes con raíces 35 días (%)	Plantas aclimatadas (%)
T-1	100	100
T-2	100	100
T-3	100	100

**Tabla 2.** Enraizamiento y aclimatación de Sn301

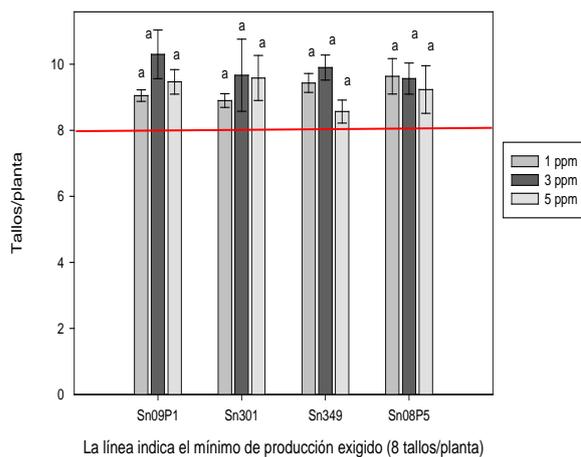
Ensayo	Esquejes con raíces 35 días (%)	Plantas aclimatadas (%)
T-1	12	62
T-2	71	81
T-3	87	85

**Tabla 3.** Enraizamiento y aclimatación de Sn349

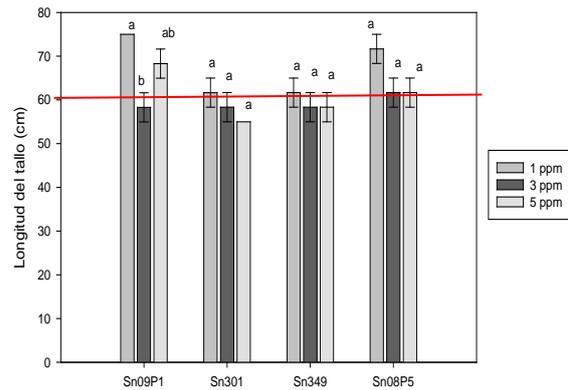
Ensayo	Esquejes con raíces 35 días (%)	Plantas aclimatadas (%)
T-1	87	53
T-2	100	78
T-3	100	93

**Tabla 4.** Enraizamiento y aclimatación de Sn08P5

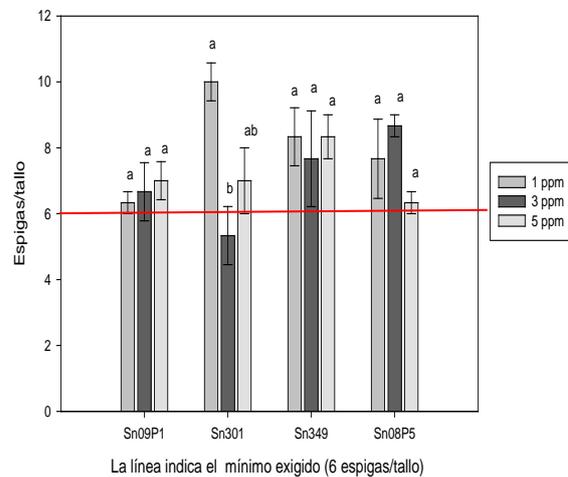
Ensayo	Esquejes con raíces 35 días (%)	Plantas aclimatadas (%)
T-1	0	100
T-2	100	90
T-3	100	70



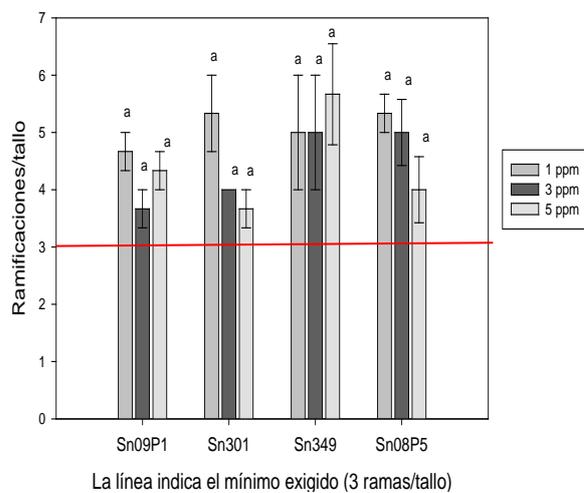
**Figura 1.** Efecto de la concentración de IBA sobre la producción de las variedades.



**Figura 2.** Efecto de la concentración de IBA sobre la longitud del tallo de las variedades.



**Figura 3.** Efecto de la concentración de IBA sobre el número de espigas por tallo.



**Figura 4.** Efecto de la concentración de IBA sobre el número de ramificaciones por tallo.