



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS Y
BIOTECNOLOGÍA
CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA



Estandarización del protocolo de micropropagación *in vitro* de Eryngium (*eryngium maritimum*) a partir de meristemas axilares en la Empresa LePlant

Trabajo de titulación, modalidad Sistematización de Experiencias Prácticas de Investigación y/o Intervención, previo a la obtención de título de Ingeniero Bioquímico, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Autor: Lourdes Alexandra Tonato Muzo

Tutor: PhD. José Homero Vargas López

Ambato - Ecuador

Enero - 2021

APROBACIÓN DEL TUTOR

PhD. José Homero Vargas López

CERTIFICA

Que el presente trabajo de titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Trabajo de Titulación bajo la Modalidad Sistematización de Experiencias Prácticas de Investigación y/o Intervención, el mismo que corresponde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad de Ciencias e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Ambato, 21 de diciembre del 2020

.....

PhD. José Homero Vargas López

C.I. 1801978048

TUTOR

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Lourdes Alexandra Tonato Muzo, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente trabajo de titulación, modalidad Sistematización de Experiencias Prácticas de Investigación y/o Intervención, previo a la obtención del título de Ingeniera Bioquímica, son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas bibliográficas.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Lourdes Alexandra', is written over a horizontal dotted line.

Lourdes Alexandra Tonato Muzo

C.I. 180456512-3

AUTOR

APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos Profesores Calificadores, aprueban el presente Trabajo de Titulación, modalidad Sistematización de Experiencias Prácticas de Investigación y/o Intervención, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Para consistencia firman:

.....

Presidente del Tribunal

.....

Dr. Mario Daniel García Solís

C.I. 110360547-1

.....

Mg. Mayra Fernanda Chico Terán

C.I. 1003327044

Ambato, 04 de enero del 2021

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este trabajo de titulación o parte de él, un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación según las normas de la Institución.

Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi trabajo, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



.....

Lourdes Alexandra Tonato Muzo

C.I. 180456512-3

AUTOR

DEDICATORIA

A mis padres Aníbal y Olga, por ser el pilar fundamental de mi vida que con sus consejos y enseñanzas diarias me han guiado, porque su apoyo incondicional en cada paso que doy han sido fundamentales para seguir y luchar por lo que quiero.

A mis hermanos, Leonardo, Geovanny, Paulina, Olga y Cecilia por siempre estar en los buenos y malos momentos de mi vida sin importar la distancia, quienes con una palabra de aliento y siendo siempre ellos mi ejemplo para no rendirme y seguir cumpliendo mis metas.

A mi mejor amiga por su amistad infinita y comprensión, por haber sido como mi hermana, una gran persona llena de valores que la caracterizaba, por ser una persona fuerte que me enseñó a luchar y no rendirme pese a las adversidades de la vida con seriedad, pero con un gran corazón. Gracias por haber formado parte de mi vida durante este camino universitario y aunque no estés aquí entre nosotros y que veas que cumplí lo que te prometí pues este logro te lo dedico a ti amiga Catabun (Catalina Caicedo) siempre te llevare en mi corazón y los recuerdos vivirán en mi memoria siempre.

Lourdes Alexandra Tonato Muzo

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios, por ser mi principal apoyo, motivación y fuerza para cada día continuar sin rendirme y agradecer infinitamente a Dios por haberme regalado los mejores padres del mundo.

A mis tutoras del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales in vitro LePlant, Mg. Alejandra Rivera y M.Sc. Paola Rivera, por darme la oportunidad de realizar mi trabajo de titulación, por su confianza, su apoyo y sus enseñanzas diarias que fueron fundamentales para la culminación de mi tesis.

A mis docentes porque con sus enseñanzas, consejos y sabiduría me han apoyado de alguna manera a llegar a esta instancia, especialmente al Dr. Homero Vargas por su guía y ayuda durante todo este proceso de titulación y al M.Sc. Yoel Hernández quienes con sus conocimientos y comprensión aportó para desarrollar el presente trabajo de titulación.

A la Facultad de Ciencias e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología por abrirme las puertas para cumplir mi meta.

A mis amigos/as y compañeros/as Crisz, Tania, Lore, Walter, Iván, Henry, Verito, Dieguito por darnos un apoyo mutuo y la fuerza para culminar nuestra meta, a Jessy (hermana), Ari, Jenny, Ery y Jhony porque en estos últimos semestres han sido parte importante en mi vida y unos buenos compañeros, amigos y consejeros.

Lourdes Alexandra Tonato Muzo

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL TUTOR	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	iii
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO	iv
DERECHOS DE AUTOR	v
DEDICATORIA	vi
AGRADECIMIENTOS	vii
ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS	viii
ÍNDICE DE TABLAS	xi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
RESUMEN	xiv
ABSTRACT.....	xv
CAPÍTULO I	1
1. MARCO TEÓRICO.....	1
1.1. Generalidades	1
1.2. Descripción botánica	1
1.3. Importancia de la especie	2
1.4. Cultivo in vitro.....	2
1.5. Micropropagación.....	3
1.5.1. Embriogénesis somática.....	3
1.5.2. Organogénesis.....	4
1.6. Medios de Cultivo	4
1.6.1. Tipos de medios	5
1.6.2. Medio de cultivo Murashige y Skoog.....	6
1.6.3. Carbohidratos.....	7
1.6.4. Vitaminas	7
1.6.5. Reguladores de crecimiento.....	7
1.6.6. Agente gelificante	8

1.7.	Etapas de cultivo in vitro	8
1.7.1.	Selección del Explante	8
1.7.2.	Desinfección	9
1.7.4.	Multiplicación	10
1.7.5.	Enraizamiento	11
1.7.6.	Aclimatación	11
1.8.	Cultivos vegetales.....	11
1.9.	Cultivo por meristemas	12
1.9.1	Meristemas con estereoscopio	12
1.9.2	Meristemas sin estereoscopio	13
1.10.	Objetivos.....	13
1.10.1.	Objetivo General	13
1.10.2.	Objetivos Específicos.....	13
1.11.	Hipótesis	13
1.11.1.	Hipótesis Nula.....	14
1.11.2.	Hipótesis Alternativa.....	14
1.12.	Variables.....	14
1.12.1.	Variables Dependiente	14
1.12.2.	Variable Independiente	14
CAPÍTULO II.....		15
2.	METODOLOGÍA	15
2.1.	Materiales, equipos y reactivos	15
2.1.1.	Materiales de laboratorio	15
2.1.2.	Equipos de laboratorio	15
2.1.3.	Reactivos.....	16
2.2.	Metodología.....	16
2.2.1.	Ubicación del laboratorio.....	16
2.2.2.	Material Colectado.....	17
2.2.3.	Selección del material vegetal	18
2.2.4.	Limpieza de la planta madre	18
2.2.5.	Etapas de Desinfección.....	19
2.2.6.	Etapas de Introducción por meristemas	20

2.2.7. Etapa de Multiplicación	22
2.2.8. Etapa de Enraizamiento	23
2.3. Procesamiento y análisis	25
CAPÍTULO III.....	26
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26
3.1. ETAPA DE DESINFECCIÓN.....	26
3.2. Etapa de Introducción.....	33
3.3. Etapa de Multiplicación.....	36
3.4. Enraizamiento.....	39
3.5. Discusión	42
3.6. Comprobación de la hipótesis.....	46
CAPÍTULO IV.....	47
4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	47
4.1. Conclusiones.....	47
4.2. Recomendaciones	48
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
ANEXOS	54

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Tratamientos de desinfección aplicados en explantes de <i>Eryngium maritimum</i>	19
Tabla 2 Tratamientos de medios de cultivo para la introducción de <i>Eryngium maritimum</i>	21
Tabla 3 Tratamientos de medios de cultivo de multiplicación para <i>Eryngium maritimum</i>	22
Tabla 4 Tratamientos de medios de cultivo de enraizamiento para <i>Eryngium maritimum</i>	24
Tabla 5 Prueba de Fisher de los parámetros vs tratamientos (T1, T2, T3) utilizados en la desinfección de la planta madre.....	26
Tabla 6 Desviación de los parámetros de evaluación obtenidos en la etapa de desinfección.....	27
Tabla 7 Desviación de las medias de los tratamientos de desinfección T1, T2 y T3 aplicados para el establecimiento in vitro de <i>Eryngium maritimum</i>	28
Tabla 8 Prueba de Tukey de los parámetros de evaluación obtenidos en la desinfección de la planta madre.....	30
Tabla 9 Prueba de Fisher de los parámetros vs tratamientos (T1, T2, T3) utilizados en la introducción de los brotes.....	33
Tabla 10 Prueba de Tukey de los parámetros de evaluación de los brotes obtenidos en la etapa de introducción.....	36
Tabla 11 Prueba de Tukey de los brotes obtenidos según los tratamientos usados en la etapa de introducción.....	37
Tabla 12 Prueba de Fisher de los parámetros vs tratamientos (T1, T2, T3) utilizados en el enraizamiento de las plántulas de <i>Eryngium maritimum</i> cultivadas in vitro.	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Fotografía satelital de la ciudad de Ambato, barrio Ficoa, ubicación del laboratorio LePlant.	17
Figura 2 Fotografía satelital del cantón Lasso, sector de la florícola “FLOWER VILLAGE CIA. LTDA”.	17
Figura 3 Ramas de <i>Eryngium maritimum</i> . Ejemplares de dos años de edad, cortados y llevados al laboratorio	19
Figura 4 Cantidad de brotes en los distintos parámetros evaluados.	28
Figura 5 Número de brotes viables en los distintos tratamientos de desinfección de plantas madre <i>Eryngium maritimum</i>	29
Figura 6 Número de brotes vs Parámetros de evaluación después de 30 días de aplicar los tratamientos de desinfección en las plantas madres.....	31
Figura 7 Brotes vs tratamientos de desinfección de plantas madre <i>Eryngium maritimum</i> (T1, T2, T3) luego de 30 días de crecimiento luego de la aplicación	32
Figura 8 Brotes vs parámetros de evaluación de los tratamientos T1, T2, T3 de desinfección luego de 30 días de crecimiento.....	32
Figura 9 Número de brotes viables en los tipos de medio de cultivo utilizados (T1 y T2) en la introducción <i>in vitro</i> de <i>Eryngium maritimum</i>	34
Figura 10 Brotes vs tratamientos de introducción de <i>Eryngium maritimum</i> , luego de 30 días de crecimiento en los medios de cultivo (T1, T2)	35
Figura 11 Brotes vs parámetros de evaluación de los tratamientos (T1, T2, T3) de introducción luego de 30 días de crecimiento.....	35
Figura 12 Plántulas de 30 días vs Tratamientos en la etapa de multiplicación de <i>Eryngium maritimum</i> ., se obtuvo el promedio de plántulas en cada tratamiento (T1, T2, T3).....	38

Figura 13 Plántulas vs parámetros de evaluación de los tratamientos (T1, T2 y T3) de la etapa de multiplicación de <i>Eryngium maritimum</i>	39
Figura 14 Valoración vs parámetros de evaluación de la etapa de multiplicación de <i>Eryngium maritimum</i>	40
Figura 15 Plántulas vs tratamientos del enraizamiento para <i>Eryngium maritimum</i>	41
Figura 16 Plántulas vs Tratamientos de la etapa de enraizamiento de plántulas de <i>Eryngium maritimum</i> se obtuvo el promedio de plántulas en cada tratamiento (T1, T2, T3).....	42

RESUMEN

Para obtener plantas estables y de calidad para cultivos agrícolas, es necesario establecer un protocolo de micropropagación que asegure estas características para que el agricultor pueda confiar en su cosecha, por ello la importancia de este método radica en las características de sus productos, en este trabajo se realizó la evaluación de parámetros en las etapas de micropropagación de *Eryngium maritimum* obtenida en la florícola FLOWER VILLAGE CIA. LTDA, se evaluó tres tratamientos de desinfección con hipoclorito de sodio, dos tratamientos de introducción con variación en la concentración de Bencilamino purina (BAP), tres tratamientos de multiplicación variando la concentración de medio Murashige y Skoog (MS) y tres tratamientos de enraizamiento variando la concentración de Ácido 1-naftalenacético (ANA) y Ácido Indol-3-Butírico (AIB), estas últimas siendo hormonas de crecimiento vegetal, en cada etapa se eligió al tratamiento que dio el mejor rendimiento de obtención de brotes mediante análisis de varianza y medias marginales.

Obtenido las formulaciones del medio en cada etapa se realizó un protocolo para la micropropagación, a pesar de mantener la asepsia y el control en cada etapa se obtuvo vitrificación en la multiplicación por lo que se redujo gran parte de los individuos que iniciaron en el proceso, pero se logró obtener organismos viables y libres de contaminación que pueden ser utilizados para aclimatación y siembra en campo, para así generar plantaciones de esta planta ornamental y expandir su producción y exportación , además se abre el campo para estudios similares con otras especies vegetales y darle valor agregado a las plantas autóctonas ecuatorianas

Palabras claves: Biotecnología vegetal, cultivo *in vitro*, micropropagación, hormonas de crecimiento vegetal, propagación clonal, brotes, microorganismos viables, LePlant.

ABSTRACT

To obtain stable and quality plants for agricultural crops, it is necessary to establish a micropropagation protocol that ensures these characteristics so that the farmer can trust his harvest, so the importance of this method lies in the characteristics of its products. In this work the evaluation of parameters was carried out in the micropropagation stages of *Erygium maritimum* obtained in the floriculture FLOWER VILLAGE CIA. LTDA, the evaluation consisted in three disinfection treatments with sodium hypochlorite, two introductory treatments with variation in the concentration of benzylaminopurine, three multiplication treatments varying the concentration of the Murashige & Skoog medium (MS) and three rooting treatments varying the concentration of indole butyric acid and naphthalene acetic acid, this was plant growth hormones, in each stage the treatment that gave the best performance in obtaining shoots was chosen through analysis of variance and marginal means.

Once the formulations of the medium were obtained in each stage, a micropropagation protocol was written, despite maintaining asepsis and control in each stage, vitrification was obtained in the multiplication, which is why a large part of the individuals who started in the process. But it was possible to obtain viable and contamination-free organisms that can be used for acclimatization and planting in the field, in order to generate plantations of this ornamental plant and expand its production and export, in addition, the field is open for similar studies with other plant species and to give added value to the native Ecuadorian plants.

Keywords: Plant biotechnology, *in vitro* culture, micropropagation, plant growth hormones, clonal propagation, sprouts, viable microorganisms, LePlant.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Generalidades

La especie *Eryngium maritimum* fue descrita por Carlos Linneo y publicada en *Species Platarum*. Es un género de planta herbácea perene de familia Apiaceae originaria de la región entre Europa del Sur hasta Asia del Oeste, se conoce también como cardo marino, ya que crece cerca a las playas.

El mejor terreno donde se desarrolla, debe tener un pH ácido, neutro o alcalino, pudiendo soportar terrenos con pocos nutrientes, prefiriendo texturas arenosas, siendo su hábitat original las dunas primarias y secundarias.

Prefieren terrenos secos o húmedos, y requieren mucha luz y temperaturas cálidas, (Khoshbakht, Hammer, & Pistrick, 2007).

1.2. Descripción botánica

Sus características principales son su raíz principal gruesa y sus tallos que pueden alcanzar hasta un metro de altura, estos son solitarios, extendidos mientras sus ramas son orientadas hacia arriba.

Sus flores tienen un tono azulado y forman una copa frondosa, con hojas radicales numerosas del tipo herbácea o ligeramente coriácea, estas son blandas y tienen un marchitamiento temprano, su morfología lo componen pecíolos largos y láminas con base cordada o redondeada.

Las láminas de las hojas tienen entre 4 a 6 cm de largo y 3 a 4 cm de ancho, son ovaladas, enteras o trilobuladas, con lóbulos oblongos (Khoshbakht, Hammer, & Pistrick, 2007).

El período de florecimiento es entre julio y octubre de cada año.

1.3. Importancia de la especie

Esta especie es conocida desde hace miles de años, en los cuales hasta historiadores como Plinio el Viejo o Dioscórides (*Naturalis Historia*, 1855) ya la habían nombrado en sus tratados, debido a sus propiedades.

Su principal uso es para tratar problemas de la piel, originados por picaduras de insectos, irritación, inflamaciones, forúnculos, ya que evita infecciones y reduce las molestias ocasionadas, (Morales, 2012), pudiendo reducir los problemas ocasionados por hemorroides con el uso continuo de la planta.

Su flor es apreciada para arreglos florales y ornamentos en general.

La totalidad de la planta es utilizada, desde la raíz, el tallo, las hojas hasta las flores como desinfectante, diaforética, antiveneno y aperitivo. Con todas las propiedades que tiene esta planta es indispensable su preservación y expansión en los territorios de la cual es autóctona, (Rojas & Usubillaga, 2004)

1.4. Cultivo *in vitro*

Se denomina Cultivo *in vitro* al conjunto de técnicas que permiten crecer un organismo en condiciones artificiales generalmente en materiales de laboratorio como recipientes de vidrios, con el suministro y control de los parámetros como nutrientes, patógenos, coadyuvantes, hormonas, pH, salinidad, temperatura que requieren para desarrollarse (Carhuaricra & Oliveira, 2012).

Las plantas aprovechan este tipo de cultivo para generar individuos de alta productividad y baja contaminación, además que facilita su propagación ya que con estos métodos la multiplicación y crecimiento es rápido y seguro (Jimenez & Agramonte, 2013).

Los tejidos vegetales tienen la ventaja de que son totipotentes, es decir pueden generar una planta completa a partir de una célula ya que pueden generar todos los tejidos al contar con la memoria genética necesaria para ello, por lo mencionado

anteriormente la obtención de tejidos vegetales por este método es tan usado hoy en día (Calva & Pérez, 2005).

La totipotencia se aprovecha para generar brotes que son clones de una misma planta madre, la cuál con los distintos subcultivos se aísla aquella que tiene las mejores condiciones, es la técnica más usada en laboratorios de aseguramiento de calidad en cultivos por la gran estabilidad genética que se logra.

1.5. Micropropagación

La técnica de obtener plantas de cultivos *in vitro* se conoce como micropropagación o propagación clonal en la que se utiliza un explante de una planta progenitora la cual debe tener características ideales para el cultivo o resistencia a agentes externos y así las plantas hijas conservarán estas características, ya que se consideran clones de la primera, este proceso es totalmente asexual y controlado, por lo que se hace en medios artificiales y requiere una última etapa de aclimatación. (Gisbert & Picó, 2017).

Existen dos tipos de micropropagación según el producto obtenido, las cuales son:

- Embriogénesis somática
- Organogénesis

1.5.1. Embriogénesis somática

En este proceso se obtiene un embrión, pero no es necesario fertilizar los gametos de la planta ya que se da de manera asexual. La embriogénesis somática tiene diversas ventajas entre ellas producir cantidades industriales de cultivos y semillas especiales. Puede ser directa e indirecta.

El producto final es una semilla viable, permite almacenarla por mayor tiempo y no es necesaria su inmediata siembra en tierra (Vences, 2016).

1.5.2. Organogénesis

El producto final son tallos, raíces o plantas completas a partir de una yema, esta se obtiene por explantes de una planta madre desarrollada.

Para obtener plantas por este método se debe seguir un procedimiento que consta de las siguientes etapas:

- Elección y acondicionamiento de la planta madre. - se descarta plantas con enfermedades o bajos rendimientos, y a la planta elegida se desinfecta de cualquier contaminante que pueda tener en su superficie.
- Introducción de meristemos. - se elige el tejido que se va a inocular, que puede ser semillas o yemas, estas se hacen germinar en el medio de cultivo seleccionado para obtener nuevos tejidos vegetales.
- Multiplicación de los brotes. - las plantas que se originaron en las fases anteriores van a dar hojas y en su base tendrán yemas, estas se cortan y se siembran para iniciar de nuevo el ciclo, de esta manera se repite aumentando el número de individuos.
- Enraizamiento. - se coloca a las plántulas en medios de cultivos con auxinas hasta que generen raíces, indicando que pueden ser trasplantados en tierra.
- Aclimatación y trasplante. – si bien en la fase anterior ya se obtienen plantas que pueden desarrollarse en tierra, estas pueden sufrir frente a las condiciones reales en campo, por ello antes de hacer este cambio se necesita adecuarlas humedad, temperatura, cantidad de luz y características del suelo en las que tendrá que crecer. Luego son sembradas en campo y siguen su ciclo de vida normal (Olmos, Echenique, & Rubinstein, 2010).

1.6. Medios de Cultivo

Son soluciones o geles que se formulan para que organismos se puedan desarrollar en ellos, tanto en su superficie como en su interior. En estos medios son

incorporados carbohidratos, vitaminas, sales, minerales, inhibidores, variación de nutrientes y compuestos químicos para regular las condiciones como pH, salinidad, etc., para que el organismo se adapte y crezca de la mejor manera.

Las plantas requieren medios sencillos para desarrollarse debido a su metabolismo que pueden usar compuestos simples y producir más complejos, por ello para plantas in vitro se puede usar cualquier formulación que se adapte con el tejido a trabajar, no contando con una formulación específica, además se puede ir variando las condiciones (pH, salinidad, nutrientes) según se requiera para tener en cuenta su mayor producción o se adapte fácilmente al entorno real al que se las va a trasplantar (Rodríguez, S, & Torres, 2004).

Para las formulaciones se requiere de macro y micronutrientes que cada uno cumple una función distinta pero esencial en la planta, la falta de uno de ellos puede ocasionar estrés y por ende menor crecimiento, mientras la presencia de algunos de ellos sirve como potenciadores.

La característica principal es que se mantienen estériles y con las condiciones estables durante el crecimiento de la planta, permitiendo que agentes externos no puedan interferir en su desarrollo (Salazar, Amaya, & Barrientos, 2013).

1.6.1. Tipos de medios

Los medios se utilizan según los requerimientos, entre los que podemos citar:

De selección. - aquellos que con la adición de compuestos permiten que solo organismos que reaccionan positivamente a dichos compuestos puedan desarrollarse.

De multiplicación. - aquel que tiene hormonas y nutrientes que facilitan la división y crecimiento de los individuos inoculados.

De identificación. - aquellos que al reaccionar los compuestos con los individuos dan señales que indican la presencia de ciertas características.

Básicos. – aquellos que tienen los nutrientes básicos para que se desarrolle un individuo.

De preservación. – aquellos que se usan para guardar un organismo por mucho tiempo sin que se dañe, se usan repiques para aumentar el tiempo de preservación (Bonilla, Pajares, & Viguera, 2016).

Existen otros medios de cultivo con objetivos específicos y usados en distintas áreas.

1.6.2. Medio de cultivo Murashige y Skoog

El medio de cultivo MS se conoce con ese nombre en honor a sus descubridores Toshio Murashige y Folke K. Skoog en 1962, que investigando las hormonas de crecimiento de tabaco identificaron la concentración de minerales que permitían a estas plantas conseguir grandes tamaños y ese conocimiento lo aplicaron a un medio que se comenzó a usar en el cultivo in vitro de plantas gracias a los macronutrientes, micronutrientes y vitaminas que se utilizan en este medio MS. (Rodríguez & Chacón, 2014)

Los macronutrientes son aquellos que se requieren en mayor medida en el organismo, por lo que son los primordiales en la dieta, sirviendo como fuente de energía, componente estructural y otras funciones esenciales en el organismo como $(\text{NH}_4)\text{NO}_3$, KNO_3 , KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, y $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, mientras tanto, los micronutrientes son incorporados en menor medida en la dieta y tienen funciones biológicas distintas entre ellos está Na_2EDTA , KI , H_3BO_3 , entre otros. (FAO, 2015).

Este medio esta formulado especialmente para el crecimiento vegetal, aportando hormonas y compuestos que aprovechan las plantas para crecer, es muy usado en cultivos in vitro, (Kumar, Branton, & Trivedi, 2018)

1.6.3. Carbohidratos

Las plantas *in vitro* requieren de fuentes de carbono debido a su escasa actividad fotosintética para desarrollar la mayoría de funciones vitales, como producción de energía o función estructural, una de las fuentes más abundantes de este elemento son los hidratos de carbono, que además son de fácil asimilación si se presentan en forma de azúcares.

Aunque las plantas son autótrofas, al estar en un medio de cultivo los nutrientes que recibe son limitados, por lo que requiere la incorporación de otros elementos para que pueda desarrollarse en las primeras etapas de crecimiento de la planta; carbohidratos complejos como sacarosa, maltosa o simples como la fructosa y la galactosa son incorporados en estos medios, controlando la concentración para mantener un equilibrio osmótico adecuado para la planta (Gabiús, Siebert, Andre, Jimenez, & Rudiger, 2004).

1.6.4. Vitaminas

Como en el caso de los carbohidratos, la falta de compuestos que naturalmente se encontrarían en la naturaleza es necesario incorporar vitaminas en pequeñas cantidades que benefician a la planta, ya sea en su metabolismo, crecimiento o estimulación de funciones orgánicas.

Las vitaminas deben ser agregadas según los requerimientos de cada planta y el objetivo que se busque con el crecimiento, siendo las más comunes tiamina (B1), ácido ascórbico (C), cianocobalamina (B12), ácido fólico, piridoxina (B6), que ayudan en el crecimiento vegetal, coenzimas, antioxidantes, (Rojas & Gomez, 2020).

1.6.5. Reguladores de crecimiento

Varias hormonas actúan como reguladoras en el crecimiento de las plantas,

afectando a tejidos específicos retardando o acelerando procesos que se dan en estas, se pueden incorporar a los medios para lograr cambios específicos en las plantas sin ser invasivos o mutilarla, si bien existen tres reguladores que son los más usados, no se puede dar una descripción de la actuación de ellos en todas las plantas, ya que depende de varios factores como el crecimiento y desarrollo de la planta (Alcántara & Godoy, 2019).

Estos reguladores son bencilaminopurina (BAP), Ácido 1-naftalenacético (ANA), Ácido indol-3-butírico (AIB), los cuales son utilizados principalmente para desarrollar raíces, aumenta el tamaño de las plantas o aumenta el número de hojas, su exceso causa el efecto contrario.

1.6.6. Agente gelificante

Agregar gomas en el medio de cultivo le da consistencia a este, permitiendo que se forme una base sólida o semisólida dependiendo de lo que se busque, también cuentan con carbohidratos y otras sustancias por lo que pueden ser una fuente de contaminación para la planta, los principales ejemplos de este tipo de agregados son Guar, Cassia, Xantana, Agar, Goma katira (Martin, 2012).

1.7. Etapas de cultivo *in vitro*

1.7.1. Selección del Explante

La primera etapa es crucial para el procedimiento posterior, es primordial elegir a los explantes más jóvenes, debido a sus características de adaptación por sus zonas menos diferenciadas, con esto se obtiene plantas que se pueden ir moldeando en las siguientes etapas.

Luego de elegir las plantas más jóvenes, se procede a extraer explantes, como yemas, hojas, raíces, semillas o cualquier otra región de la planta (Ochoa, Rivera, & Gómez, 2016).

1.7.2. Desinfección

Al tener separados los explantes, se requiere una esterilización que empieza con una desinfección superficial para eliminar especialmente hongos y bacterias, estos microorganismos aprovechan los nutrientes del medio de cultivo y disminuyen el desarrollo de las plantas, aumenta la contaminación y disminuye la eficiencia del trabajo y la producción.

Para lograr este objetivo se utiliza compuestos químicos, que no dañen la integridad del explante y logren exterminar los microorganismos, además, se debe mantener la condición de esterilidad en todo momento luego de la desinfección (Bedoya, Yaneth, & Milena, 2016).

1.7.3. Establecimiento *in vitro*

Esta etapa se trata de colocar el explante en el medio de cultivo para que inicie su conversión en una planta funcional, entran en juego las fitohormonas para el desarrollo fisiológico en ciertas zonas de la planta, entre ellas se encuentran las auxinas y las citoquininas.

Los distintos tipos de auxinas generan distintos efectos entre ellos:

Ácido indolacético (IAA). - encargado de la diferenciación celular, promueve que se sintetice el ARN mensajero, y se producen proteínas estructurales, evita que se produzcan yemas axiales, promueve la aparición de raíces laterales y adventicias.

Ácido naftalenacético (ANA). – es un regulador de crecimiento que fomenta la división celular, pero en altas concentraciones es un inhibidor, permite la formación de raíces, (Báez-Pérez, González-Molina, Bautista-Cruz, & M, 2015).

Ácido Indolbutírico (AIB). – al contrario que el IAA, este promueve la aparición de raíces adventicias y laterales, permite que los nutrientes sean absorbidos más eficientemente y optimiza las funciones metabólicas (Báez-Pérez, González-Molina, Bautista-Cruz, & M, 2015).

Las citoquininas al igual que las auxinas tienen efectos como la dominancia apical, estas promueven la formación de yemas laterales mientras que en las raíces es al contrario ya que estimulan la formación de raíces centrales e inhibe las laterales, evitan que se envejezca la planta en otoño, llamada retraso de senescencia foliar.

Si bien estos son los efectos más comunes que se dan en las plantas, puede existir especies en los cuales tenga otro resultado, o que la concentración no sea la suficiente para desarrollar estos efectos, requiriendo realizar pruebas de balance hormonal.

El balance hormonal es el estado de la planta donde las hormonas como auxinas, citoquinas, giberelinas, etc, están presentes en la concentración adecuada para conseguir un correcto funcionamiento del organismo completo además de su crecimiento y desarrollo, un aumento en cualquiera de ellas genera un efecto en una parte específica de la planta o afecta a todo el organismo, (Jimenez A. , 2017).

Por ello es importante el balance hormonal para desarrollar los tejidos requeridos y no un desarrollo completo de la planta, ya que al tener hormonas para controlar partes específicas permite obtener plantas con características que serán aprovechadas en los procesos posteriores.

1.7.4. Multiplicación

Se aprovecha los explantes que crecieron de las dos etapas anteriores, en ellos surgen ya estructuras como brotes, de las que se utiliza las yemas para replantarlas y así obtener un mayor número de individuos con las mismas características que la planta progenitora.

Estas dos últimas etapas se realizan en cámara de flujo para evitar contaminación, además que los instrumentos y materiales utilizados deben ser esterilizados antes de su uso con las plantas.

Se debe realizar una estimación sobre el tiempo adecuado de resiembra, ya que si se usa brotes que no estén en condiciones, la multiplicación se verá afectada (Casas,

2010).

1.7.5. Enraizamiento

En este proceso se obtiene un número amplio de individuos vegetales, los cuales se requiere que formen raíces, y se obtiene aumentando la relación entre auxinas y citoquininas, reguladores del crecimiento en especial de estos tejidos, o en ausencia de estas.

Cuando los individuos alcanzan 2 centímetros, se cambian a medios con o sin hormonas de crecimiento (según sea el caso) y empiezan a desarrollar tejidos diferenciados (Rojas & Cuzquén, 2014).

1.7.6. Aclimatación

Las plantas que se desarrollan *in vitro* no cuentan con protecciones ante las condiciones adversas del exterior, entre ellas las ceras en las hojas que evita la evaporación del agua interna, siendo un problema la pérdida de humedad en condiciones ambientales normales.

Para evitar esto se intercambia el sustrato y el lugar de cultivo a condiciones más cercanas a las que se van a plantar, de esta manera en pocos días desarrollan ceras epicuticulares y reducen el intercambio de humedad para sostenerse por sí mismas.

Otro factor que también se regula en esta etapa es la falta de luz, porque en condiciones *in vitro* el suministro de este factor es mínimo, reduciendo la fotosíntesis, por lo que se debe ir aumentando gradualmente la luz hasta alcanzar valores normales (Gepts, 2006).

1.8. Cultivos vegetales

Se puede tomar cualquier parte de la planta para desarrollar un explante gracias a su gran capacidad de multiplicación celular, por ello dependiendo del estudio realizado o del tipo de planta se pueden ocupar:

- Raíces
- Embriones
- Meristemos apicales
- Yema axilar
- Hojas
- Suspensiones celulares

Dependiendo de la capacidad de reproducción de la planta en tratamiento, cada parte tendrá su tratamiento específico para obtener los mejores resultados, incluyendo pasos adicionales o reduciéndolos, hasta obtener una planta formada completa (Albarrán, Fuenmayor, & Fuchs, 2013).

1.9. Cultivo por meristemos

Uno de los tejidos más aprovechados en cultivos *in vitro* son los meristemos, que son tejidos formados por células totipotentes y pueden generar cualquier célula de la planta, permite generar tejidos enteros y hasta plantas completas a partir de una parte pequeña, que además tienen facilidad de dividirse y se conservan jóvenes todo el tiempo (Villavicencia, 2012).

Se consideran el explante ideal, y por ello es el que se utiliza en la criopreservación y la conservación de germoplasma en especies vegetales, ya que puede utilizar para multiplicar individuos a partir de pequeñas muestras (Irondo, 2001).

Existen meristemos apicales, laterales e intercalares.

1.9.1 Meristemos con estereoscopio

El estereoscopio permite identificar las estructuras características de un meristemo, y de esta manera poder extraerlos de la planta madre, entre estas estructuras tenemos a los primordios foliares, la túnica, el corpus y el meristemo apical caulinar (Megías, Molist, & Pombal, 2020).

Al encontrar estas regiones, se procede a delimitar y cortar el tejido para obtener un

meristemo limpio mediante la utilización del lente estereoscópico. Sin embargo, la utilización de este equipo puede verse afectada en la determinación precisa del meristemo.

1.9.2 Meristemos sin estereoscopio

La identificación sin estereoscopio se basa principalmente en analizar el crecimiento de las células con parte de la estructura que un meristemo presenta, ya que las células meristemáticas crecen sin alargarse, al contrario de las células diferenciadas. El no uso de este equipo influye en la identificación de un meristemo limpio libre de estructuras y /o capas (primordio foliar) que recubren al meristemo.

1.10. Objetivos

1.10.1. Objetivo General

- Estabilizar un protocolo de micropropagación in vitro de *Eryngium maritimum* a partir de tejido meristemático.

1.10.2. Objetivos Específicos

- Experimentar diversos procesos en las diferentes etapas de micropropagación in vitro como la desinfección, introducción, multiplicación y enraizamiento de cultivos meristemáticos axilares de *Eryngium maritimum*.
- Definir un tratamiento óptimo para la introducción a partir de meristemos de *Eryngium maritimum*
- Determinar el medio de cultivo y su formulación adecuada para la multiplicación de *Eryngium maritimum*
- Estabilizar un medio de cultivo formulado para el enraizamiento de *Eryngium maritimum*

1.11. Hipótesis

Existe un equilibrio óptimo de hormonas y agregados de crecimiento vegetal que proporcionan las condiciones adecuadas para el establecimiento, micropropagación

y enraizamiento *in vitro* de *Eryngium maritimum*.

1.11.1. Hipótesis Nula

El proceso de establecimiento, micropropagación y enraizamiento *in vitro* de *Eryngium maritimum* no genera plantas viables.

1.11.2. Hipótesis Alternativa

El proceso de establecimiento, micropropagación y enraizamiento *in vitro* de *Eryngium maritimum* genera plantas viables.

1.12. Variables

1.12.1. Variables Dependiente

Brotos de *E. maritimum*, contaminación, hongos.

1.12.2. Variable Independiente

Concentración de desinfectante, tiempos de tratamiento, concentración de hormonas.

CAPÍTULO II

2. METODOLOGÍA

2.1. Materiales, equipos y reactivos

2.1.1. Materiales de laboratorio

Matraces de varios volúmenes

Probetas volumétricas

Vaso de precipitación de varios volúmenes

Mechero de alcohol

Micropipetas de varias capacidades

Puntas de micropipeta de varios volúmenes

Pipetas graduadas

Pipeteador manual

Gradillas

Tubos de ensayo

Cajas Petri

2.1.2. Equipos de laboratorio

Cámara de flujo laminar

Autoclave

Balanza analítica

Plancha de calentamiento

Potenciómetro

2.1.3. Reactivos

Medio Básico Murashige Skoog (MS)

Bencilamino purina (BAP)

Ácido 1-naftalenacético (ANA)

Ácido Indol-3-Butírico (AIB)

Sacarosa

Agar

Ácido clorhídrico (HCl)

Hidróxido de sodio (NaOH)

Hipoclorito de sodio (NaClO)

Alcohol 100%

2.2. Metodología

2.2.1. Ubicación del laboratorio

El presente trabajo se realizó en las instalaciones del laboratorio de cultivo *in vitro* LePlant, ubicado en la Av. Los Guaytambos y la Delicia (altos de Aventubike) en el cantón Ambato, provincia de Tungurahua.

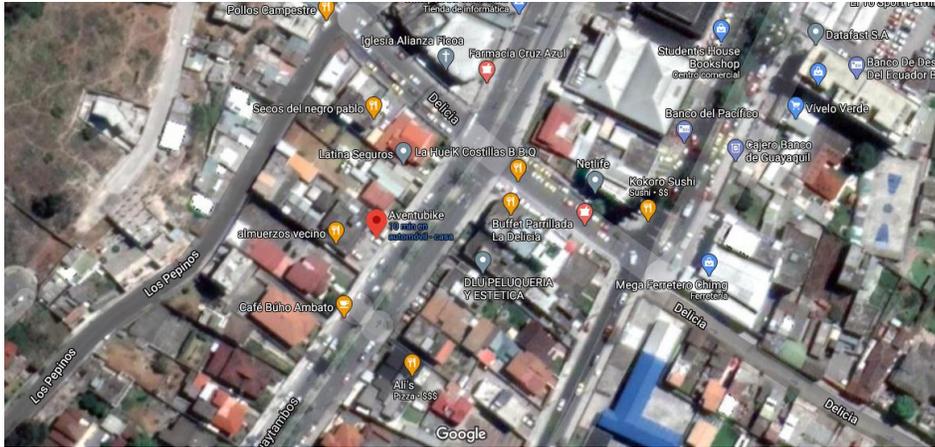


Figura 1 Fotografía satelital de la ciudad de Ambato, barrio Ficoa, ubicación del laboratorio LePlant.

Fuente: Google Maps

2.2.2. Material Colectado

La recolección del material se realizó en la florícola “FLOWER VILLAGE CIA. LTDA” que se encuentra en el cantón Lasso, provincia de Cotopaxi, se recolecto varias ramificaciones de *Eryngium maritimum* de dos años de edad.

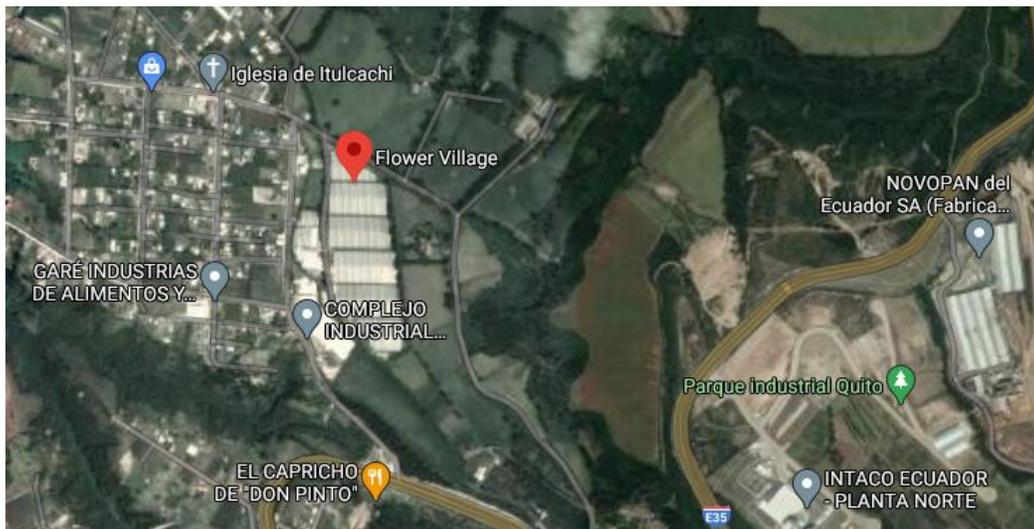


Figura 2 Fotografía satelital del cantón Lasso, sector de la florícola “FLOWER VILLAGE CIA. LTDA”.

Fuente: Google Maps

2.2.3. Selección del material vegetal

El material vegetal se eligió a partir de plantas madre que se encuentran en campo de aproximadamente dos años de edad, considerando las plantas de mejor calidad, de las cuales se cortó ramas de 30 a 50 cm de longitud aproximadamente, fueron envueltas en papel periódico para su conservación y transporte al laboratorio de cultivo *in vitro* LePlant (Ambato). En el laboratorio las muestras son inmediatamente tratadas para evitar la oxidación del tejido o un posible daño del material vegetal que afecte la introducción de la misma.

2.2.4. Limpieza de la planta madre

Se realizaron estudios preliminares para la determinación y estudio de los diseños experimentales de cada protocolo, utilizado para el establecimiento del sistema de cultivo *in vitro* de *Eryngium maritimum*. Las ramas colectadas fueron desinfectadas superficialmente para obtener los explantes iniciales que son meristemas axilares.

Esta desinfección previa de las ramas consistió en cortar las hojas, las estacas obtenidas se lavaron con agua y detergente utilizando un cepillo dental de cerdas suaves y se enjuago con agua corriente del grifo. A partir de cada estaca se extrajo segmentos nodales de aproximadamente 1 cm de longitud que contienen las yemas axilares, las cuales fueron colocadas en frascos de vidrio protocolo basado en los estudios de Roca & Mroginski (1993).



Figura 3 Ramas de *Eryngium maritimum*. Ejemplares de dos años de edad, cortados y llevados al laboratorio

Fuente: Tonato,L. (2020)

2.2.5. Etapa de Desinfección

Una vez obtenidos los segmentos nodales en los frascos, se procedió a utilizar diferentes métodos de desinfección con solución de agua jabonosa, hipoclorito de sodio (3% y 5%) y etanol (70%). Después de realizar este procedimiento con cada solución desinfectante se lavó los brotes con agua corriente fuera de cámara de flujo laminar y con agua estéril dentro del cuarto de siembra.

Tabla 1

Tratamientos de desinfección aplicados en explantes de *Eryngium maritimum*.

Soluciones Desinfectantes	Tratamiento 1	Tratamiento 2	Tratamiento 3
	Tiempo (min)	Tiempo (min)	Tiempo (min)
Agua con jabón antibacterial	20	20	20

Hipoclorito de sodio 5%	5	-	-
Hipoclorito de sodio 3%	-	12	15
Alcohol industrial 70%	1	1	1

Se probó tres tratamientos de desinfección variando tiempo y concentración de las soluciones desinfectantes como se muestran en la tabla 1, obteniendo diferentes resultados. La viabilidad al utilizar estos tratamientos fue alta por lo que se utilizó los meristemas como explante inicial para la introducción *in vitro* de *Eryngium maritimum*, en esta fase se evaluaron diferentes parámetros como contaminados con bacteria, contaminados con hongo, oxidados potenciales, oxidados muertos y viables.

Se evaluaron 150 tubos por cada tratamiento y a su vez se realizaron pruebas por triplicado, los resultados obtenidos fueron evaluados mediante un Diseño Factorial A x B, de esta manera se determinó el mejor tratamiento en la etapa de desinfección de *Eryngium maritimum*, es importante aclarar que para determinar el efecto que tiene el proceso de desinfección en meristemas axilares los explantes fueron sembrados en el medio de cultivo detallado en la fase de establecimiento.

2.2.6. Etapa de Introducción por meristemas

Cuando se tiene listo el material vegetal, se procede a obtener los brotes para pasos posteriores, siguiendo el protocolo establecido por Roca & Mroginski (1993).

Para esta etapa se utilizaron dos tratamientos de medio de cultivo (T1 y T2) cuya

composición se basa en el medio Murashige y Skoog (1962) (Kumar, Branton, & Trivedi, 2018) con ciertas modificaciones que se detallan en la tabla 2.

Tabla 2

Tratamientos de medios de cultivo para la introducción de *Eryngium maritimum*.

MEDIOS DE CULTIVO		
REACTIVOS	T1	T2
Murashige Skoog (MS)	100%	100%
BAP	1 ml/L	2 ml/L
AIB	0,1 ml/L	0,1 ml/L
Sacarosa	30 g/L	15 g/L
Agar	7 g/L	7 g/L
pH	5,8	5,8

La tabla 2 muestra los dos tratamientos utilizados para el establecimiento e introducción, en el cual se evaluó el efecto de variación en concentración de Sacarosa y BAP manteniendo constante los demás componentes representados en la tabla, el medio de cultivo fue dispensado en tubos de ensayo en cantidad de 2 ml en cada tubo y se esterilizo en una autoclave por 20 min a 121°C y 15 psi.

En una cámara de flujo se realizó el proceso de siembra, los meristemos extraídos

directamente se sembraron uno por tubo en los medios de cultivo preparados (tabla 2). Los explantes sembrados en los tubos fueron sellados con plástico film, colocados en gradillas con su respectiva rotulación y almacenados en el cuarto de crecimiento a una temperatura de 23°C, con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad. La evaluación de los tubos se realizó cada 7 días durante 30 días.

Para verificar la efectividad del medio de cultivo en esta etapa la variable considerada fue la viabilidad de los explantes.

2.2.7. Etapa de Multiplicación

En esta etapa se mantienen los protocolos establecidos por (Roca & Mroginski, 1993) para cultivos *in vitro*, y de igual manera se realiza dos tratamientos diferentes al medio de cultivo para evaluar su efectividad en la planta, variando ciertos componentes de estos, se denominan a T1, T2 y T3.

Para esta etapa, a partir del medio utilizado en introducción con mejores resultados, se realizaron modificaciones en concentración de Murashige Skoog (MS) y la disminución de agar, obteniendo los tratamientos mostrados en la tabla 3.

Tabla 3

Tratamientos de medios de cultivo de multiplicación para *Eryngium maritimum*.

MEDIOS DE CULTIVO			
REACTIVOS	T1	T2	T3
Murashige Skoog (MS)	100%	75%	50%
BAP	1ml/L	1ml/L	1ml/L

AIB	0,1ml/L	0,1ml/L	0,1ml/L
Sacarosa	30g/L	30g/L	30g/L
Agar	7g/L	6,9g/L	6,9g/L
pH	5,7	5,7	5,7

Se agregaron 25 ml de medio de cultivo en frascos de vidrio de un volumen de 250 ml, se procedió a tapar los frascos y se esterilizo en la autoclave por 20 minutos a 121°C y 15 psi

Una vez realizado el proceso de esterilización de los medios de cultivo se llevaron a la cámara de flujo laminar con el fin de sembrar nuevos brotes en los frascos con medio (8 unidades experimentales por frasco) y sellados con plástico film, estos frascos fueron almacenados en el cuarto de crecimiento e incubado a una temperatura de 23°C, a un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad. La evaluación se realizó cada 7 días durante 30 días.

En esta etapa de multiplicación las variables de estudio fueron el número de brotes, tamaño de la planta y número de hojas.

Los datos fueron analizados mediante el diseño factorial A x B y una prueba Tukey para elegir el mejor tratamiento de esta etapa de micropropagación de *Eryngium maritimum*.

2.2.8. Etapa de Enraizamiento

Al no ser una especie de planta que genera raíces en el medio de multiplicación, requiere cambiar a un medio de enraizamiento, por lo que se continua con el protocolo de Roca & Mroginski (1993).

En esta etapa se utilizó 3 diferentes medios de cultivo, donde la variación de concentración es de AIB y agar con el fin de observar el mejor tratamiento para que las raíces puedan crecer favorablemente y sean útiles para su posterior aclimatación.

Tabla 4

Tratamientos de medios de cultivo de enraizamiento para *Eryngium maritimum*.

REACTIVOS	MEDIOS DE CULTIVO		
	T1	T2	T3
Murashige Skoog (MS)	100%	100%	100%
BAP	0,1ml	0,1ml	0,1ml
AIB	-	0,5ml	0,1ml
ANA	0,5ml	0,5ml	0,5ml
Sacarosa	30g	30g	30g
Agar	7g	7g	7g
pH	5,7	5,7	5,7

Una vez que se preparó el medio de cultivo, se vertió 25 ml en frascos de vidrio y se esterilizó en la autoclave por 20 minutos a una temperatura de 121°C y 15 psi. Después de este proceso, en la cámara de flujo laminar los frascos fueron sembrados con brotes (10 unidades experimentales por frasco) y sellado con plástico film para

ser almacenado en el cuarto de siembra. En condiciones de temperatura de 23°C y a un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad. La evaluación se realizó cada 7 días durante 30 días.

En esta etapa se analizó los resultados de variación en la concentración de AIB y el incremento de ANA para los tres tratamientos. Las variables evaluadas fueron número de raíces por planta, tamaño de la raíz y el tamaño de la planta.

Los datos se evaluaron mediante diseño factorial A x B y la realización de la prueba de Tukey, determinando así que tratamiento es el idóneo para la fase de enraizamiento de *Eryngium maritimum*.

2.3. Procesamiento y análisis

Se realizó diseños experimentales a los procesos de introducción, multiplicación y enraizamiento para identificar la formulación que da mejor resultado en el crecimiento y adaptación de los especímenes de *Eryngium maritimum* mediante cultivo *in vitro*, además se analizó la varianza y las medias marginales y se realizó pruebas de comprobación de hipótesis para determinar cuál tratamiento fue el más significativo para las etapas.

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. ETAPA DE DESINFECCIÓN

Tabla 5

Prueba de Fisher de los parámetros vs tratamientos (T1, T2, T3) utilizados en la desinfección de la planta madre

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	GL	Cuadrático promedio	F	Sig.
Modelo corregido	675645,778	14	48260,413	205,655	0,000
interceptación	258402,222	1	258402,222	1101,146	0,000
Parámetros Evaluación	653446	4	163361,5	696,143	0,000
Tratamientos	1986,711	2	993,356	4,233	0,024
Parámetros*Tratamientos	20213,067	8	2526,633	10,767	0,000
Error	7040	30	234,667		
Total	941088	45			
Total corregido	682685,778	44			

Realizando los cálculos (Anexos 1 y 2) para los parámetros de contaminación por hongos, bacterias, oxidación potencial, muertos por oxidación e individuos viables junto a los tres tratamientos 5% cloro 5 min, 3% cloro 12 min y 3% cloro 15 min, se determinó que tanto las interacciones de los parámetros evaluados y los tratamientos (Anexo 3) como estos de manera individual si presentan diferencias significativas entre ellos, siendo los valores calculados F mucho más altos que los valores de significancia, por ello es importante identificar cuáles fueron los tratamientos que dieron los mejores resultados en términos de individuos viables.

Tabla 6

Desviación de los parámetros de evaluación obtenidos en la etapa de desinfección

Parámetros de evaluación	Media brotes	Porcentaje %	Error estándar	Límite inferior	Límite superior
Hongo	4	0,89	5,106	-6,540	14,317
Bacteria	12	2,67	5,106	1,460	22,317
Oxidación potencial	18	4	5,106	7,349	28,206
Oxidación muertos	29	6,44%	5,106	18,683	39,540
Viables	316	70,22%	5,106	305,794	326,651

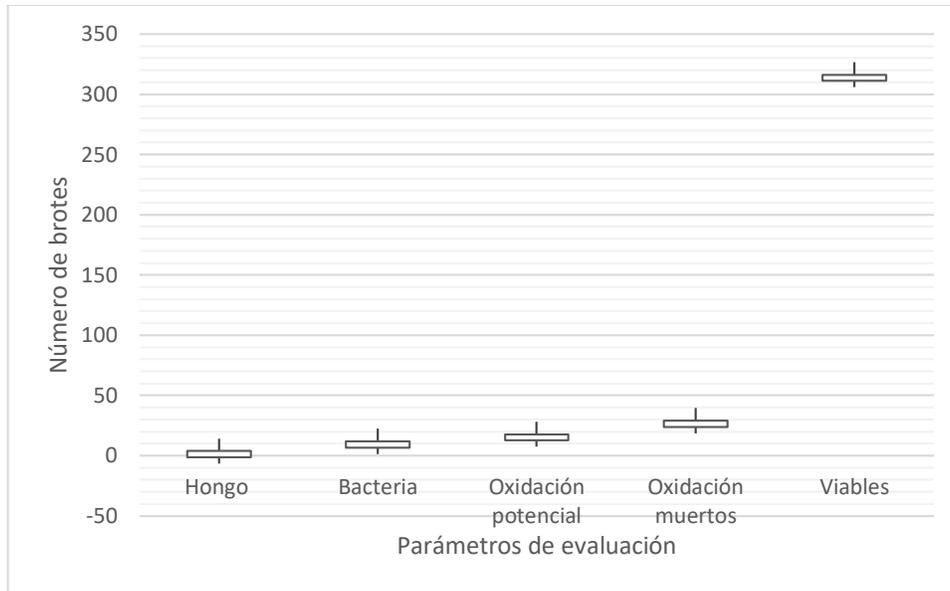


Figura 4 Cantidad de brotes en los distintos parámetros evaluados.
Fuente: Tonato,L. (2020)

Se identificó que la contaminación en las plantas es muy baja, alcanzando un porcentaje de contaminación de hongo y bacteria de 3,56%, mientras la oxidación se presentó en 4% de oxidación potencial y 6,44% de brotes muertos por oxidación.

Esto acompañado que un 70,22% son brotes viables, indica que el proceso de desinfección en las plantas no es un factor de riesgo para disminuir los brotes viables al inicio del proceso, es necesario buscar otros métodos de desinfección menos agresiva para que los brotes no generen oxidación, además, se debe aumentar el control de contaminación cruzada al momento de inocular los brotes en los medios de cultivo.

Tabla 7

Desviación de las medias de los tratamientos de desinfección T1, T2 y T3 aplicados para el establecimiento in vitro de *Eryngium maritimum*.

Tratamiento	Media brotes	Error estándar	Límite inferior	Límite superior
T1	68	3,955	59,722	75,878
T2	84	3,955	75,989	92,144
T3	75	3,955	67,389	83,544

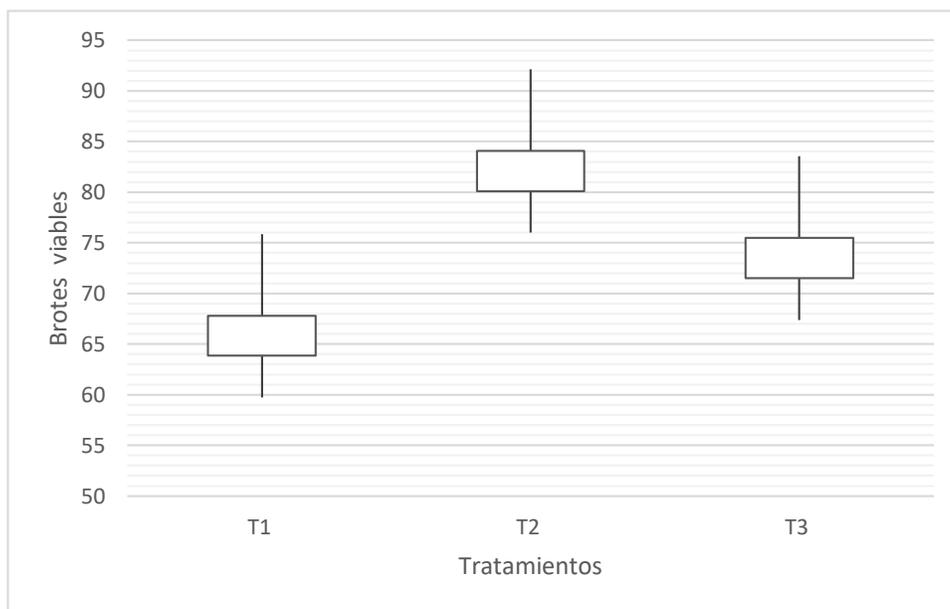


Figura 5 Número de brotes viables en los distintos tratamientos de desinfección de plantas madre *Eryngium maritimum*.
Fuente: Tonato,L. (2020)

Al analizar los tratamientos de desinfección aplicados a los brotes, se identificó que el mejor tratamiento es el T2 (3% de cloro por 12 minutos) y el menos eficiente fue el T1 (5% cloro por 5 minutos), según lo observado en la ilustración 5 para la media de brotes viables obtenidos. (Anexo 4)

Tabla 8

Prueba de Tukey de los parámetros de evaluación obtenidos en la desinfección de la planta madre

		Subconjunto			
Parámetros de evaluación		N	1	2	3
HSD Tukey	Hongo	9	3,89		
	Bacteria	9	11,89	11,89	
	Oxidación potencial	9	17,78	17,78	
	Oxidación muertos	9		29,11	
	Viables	9			316,22
	Sig		0,327	0,147	1
Tukey B	Hongo	9	3,89		
	Bacteria	9	11,89	11,89	
	Oxidación potencial	9	17,78	17,78	
	Oxidación muertos	9		29,11	

Viables

9

316,22

Al realizar las pruebas de comparación de los parámetros de evaluación, se identificó que el parámetro más perjudicial fue el de la muerte por oxidación mientras la contaminación por hongos tuvo un valor muy bajo de 3,89, esto en comparación con los brotes viables de 316,22.

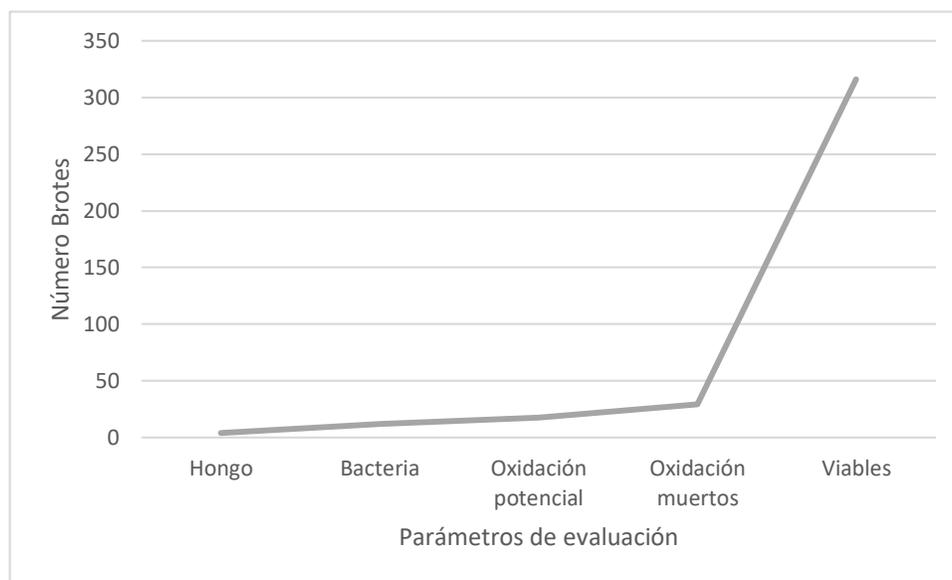


Figura 6 Número de brotes vs Parámetros de evaluación después de 30 días de aplicar los tratamientos de desinfección en las plantas madres

Fuente: Tonato,L. (2020)

Se observa una clara diferencia entre los brotes viables y los no viables según los distintos parámetros estudiados como la contaminación y oxidación, es necesario estudiar más a fondo el efecto del cloro en los brotes, ya que a pesar que la media de 29 brotes muertos y 18 contaminados no tiene mucha significancia en este estudio, para estandarizar este método generaría pérdidas a las empresas que lo realicen.

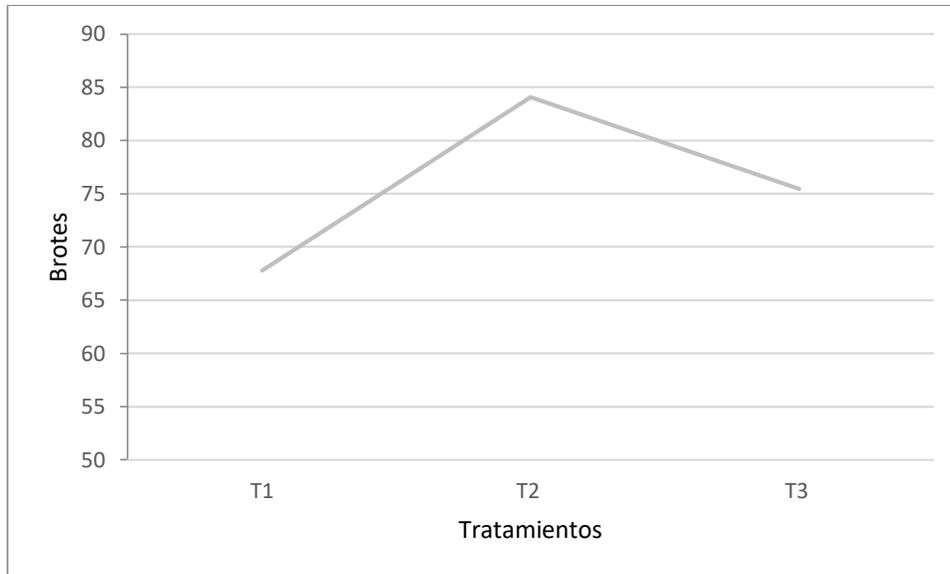


Figura 7 Brotos vs tratamientos de desinfección de plantas madre *Eryngium maritimum* (T1, T2, T3) luego de 30 días de crecimiento luego de la aplicación
Fuente: Tonato,L. (2020)

Como se observa en la figura 7, el mejor tratamiento es el de 3% cloro por 12 minutos, en estas condiciones se produce la mayor cantidad de individuos viables para etapas posteriores, siendo muy superior a los otros dos tratamientos.

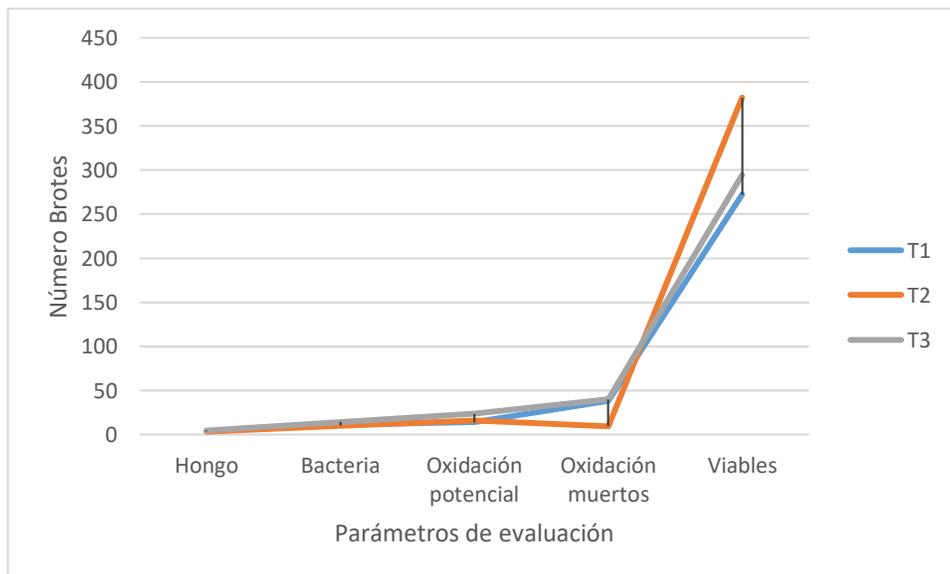


Figura 8 Brotos vs parámetros de evaluación de los tratamientos T1, T2, T3 de desinfección luego de 30 días de crecimiento.
Fuente: Tonato,L. (2020)

Al comparar los tratamientos y las medias de los parámetros obtenidos en cada uno, se obtiene que el número de hongos y bacterias en todos los tratamientos es el mismo, mientras que la oxidación potencial es cercana entre los tres y baja considerablemente en el tratamiento T2, mientras en T1 y T3 tienen valores similares y los valores más altos se encuentran en los oxidados muertos a diferencia que sus valores son bajos en el T2, los individuos viables que se obtiene con T2 es mucho mayor que T1 y T3, esto apoyado con los resultados anteriores, hace que el mejor tratamiento para desinfección de las plantas sea T2 de 3% cloro por 12 minutos.

3.2. Etapa de Introducción

Tabla 9

Prueba de Fisher de los parámetros vs tratamientos (T1, T2, T3) utilizados en la introducción de los brotes

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	GL	Cuadrático promedio	F	Sig.
Modelo corregido	104282,167	9	11586,9074	45,816	0,000
interceptación	33000,933	1	33000,933	130,49	0,000
Parámetros Evaluación	98465,667	4	24616,4168	97,337	0,000
Tratamientos	800,833	1	800,833	3,167	0,090
Parámetros*Tratamientos	5015,667	4	1253,91675	4,958	0,006

Error	5058	20	252,9
Total	14,2341,000	30	
Total corregido	109340,167	29	

Se observó que los parámetros y tratamientos tuvieron diferencias significativas en la introducción de meristemas pasados previamente por la desinfección, cabe acotar que el método de desinfección T2 usado fue el que tuvo mejor rendimiento.

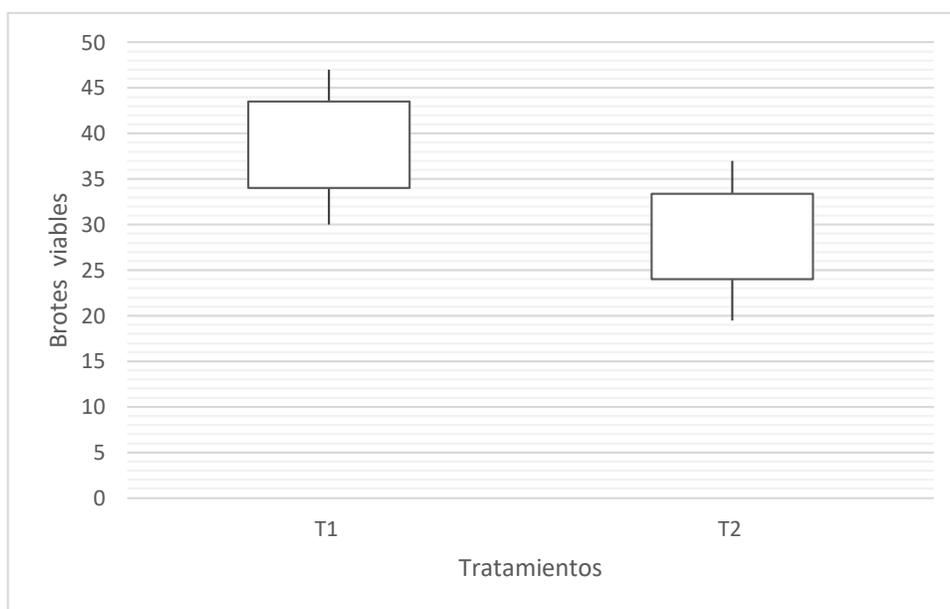


Figura 9 Número de brotes viables en los tipos de medio de cultivo utilizados (T1 y T2) en la introducción *in vitro* de *Eryngium maritimum*.

Fuente: Tonato,L. (2020)

Se observó en la figura 9 que el tratamiento que mejores resultados da para el establecimiento *in vitro* llamado introducción de *Eryngium maritimum* es el denominado T1, con lo que es elegido para el protocolo de micropropagación y se usa como medio base para generar los brotes para las siguientes etapas.

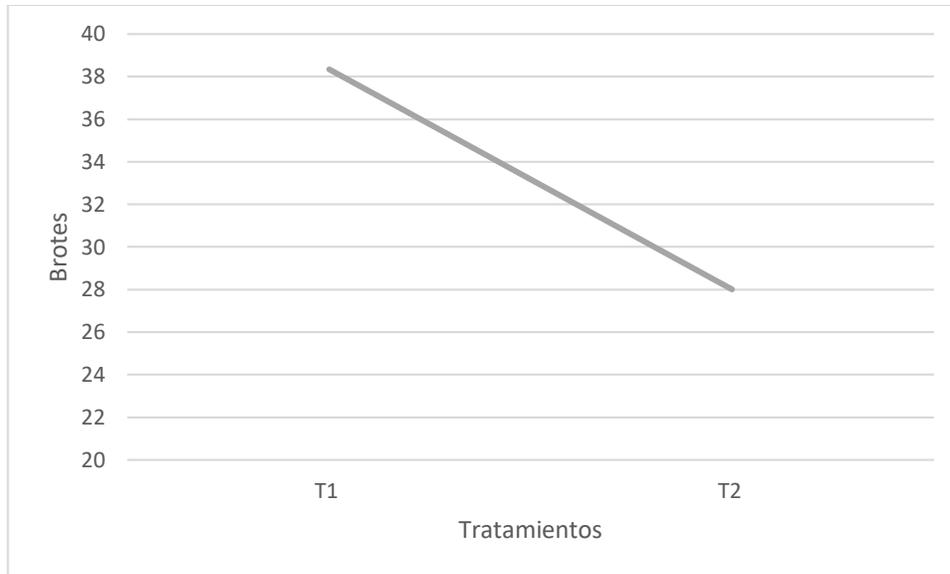


Figura 10 Brotos vs tratamientos de introducción de *Eryngium maritimum*, luego de 30 días de crecimiento en los medios de cultivo (T1, T2)
Fuente: Tonato,L. (2020)

Al igual que en el diagrama de cajas y bigotes, se observa que el T1 es el que mejor rendimiento da, siendo más de 10 puntos de diferencia entre ambos.

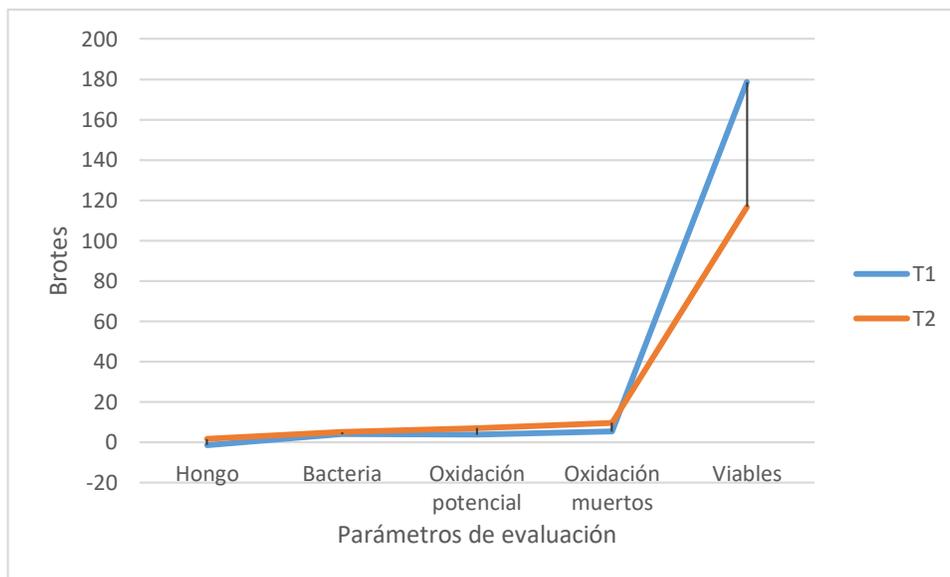


Figura 11 Brotos vs parámetros de evaluación de los tratamientos (T1, T2, T3) de introducción luego de 30 días de crecimiento.
Fuente: Tonato,L. (2020)

La contaminación en ambos medios fue similar tanto en hongos, bacterias y oxidación de los brotes, mientras en individuos viables si se obtuvo una gran diferencia, demostrando que la contaminación depende de la desinfección previa y que la viabilidad depende del medio de introducción, que se usa, siendo el mejor tratamiento el de 1 ml de BAP. (Anexo 5 y 6)

3.3. Etapa de Multiplicación

Tabla 10

Prueba de Tukey de los parámetros de evaluación de los brotes obtenidos en la etapa de introducción

		Subconjunto		
		N	1	2
Parámetros de evaluación				
HSD Tukey	Tamaño de planta	9	2,1	
	Número de brotes	9	2,7222	
	Número de hojas	9		7,5556
Sig			0,087	1
Tukey B	Tamaño de planta	9	3,89	
	Número de brotes	9	11,89	11,89

Número de hojas	9	17,78	17,78
-----------------	---	-------	-------

En los tratamientos de multiplicación, se determinó que las plántulas tienen un mayor número de hojas que de brotes o de la ponderación en relación al tamaño de la planta, siendo el primero el que mayor incidencia tuvo en la elección del medio de multiplicación. (Anexo 7)

Tabla 11

Prueba de Tukey de los brotes obtenidos según los tratamientos usados en la etapa de introducción

		N	Subconjunto	
Parámetros de evaluación			1	2
HSD Tukey	100% MS	9	3,6667	
	50% MS	9	4,0444	4,0444
	75% MS	9		4,6667
	Sig		0,373	0,087
Tukey B	100% MS	9	3,6667	
	50% MS	9	4,0444	4,0444

75% MS	9	4,6667
--------	---	--------

Otro de los factores evaluados en este estudio (Anexo 8) para multiplicar los explantes es la concentración del medio MS, con tres concentraciones distintas (100%, 75% y 50%), dando resultados similares entre ellos ya que el menor tiene 3,667 y el mayor 4,667; por ello se elige al de 75% de MS como el ideal para el desarrollo de explantes, en esta parte del proceso se perdió alrededor del 30% de las plantas obtenidas en la desinfección e introducción debido a un problema de vitrificación del medio.

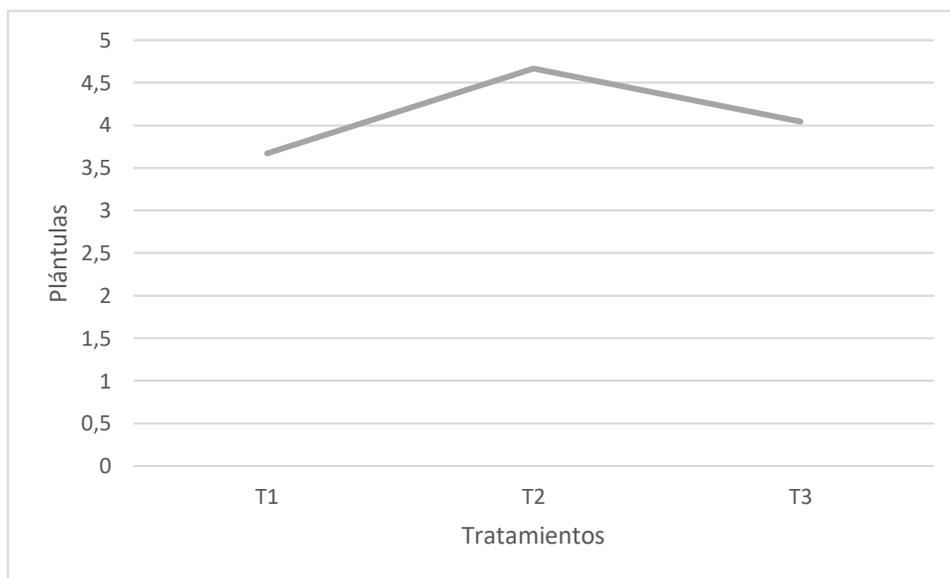


Figura 12 Plántulas de 30 días vs Tratamientos en la etapa de multiplicación de *Eryngium maritimum.*, se obtuvo el promedio de plántulas en cada tratamiento (T1, T2, T3)

Fuente: Tonato,L. (2020)

Al graficar las medias obtenidas en cada concentración de medio MS se observó que el medio con concentración de 75% tiene un rendimiento más alto que los otros dos, y como se vio en la comparación de Tukey será el elegido para procesos posteriores.

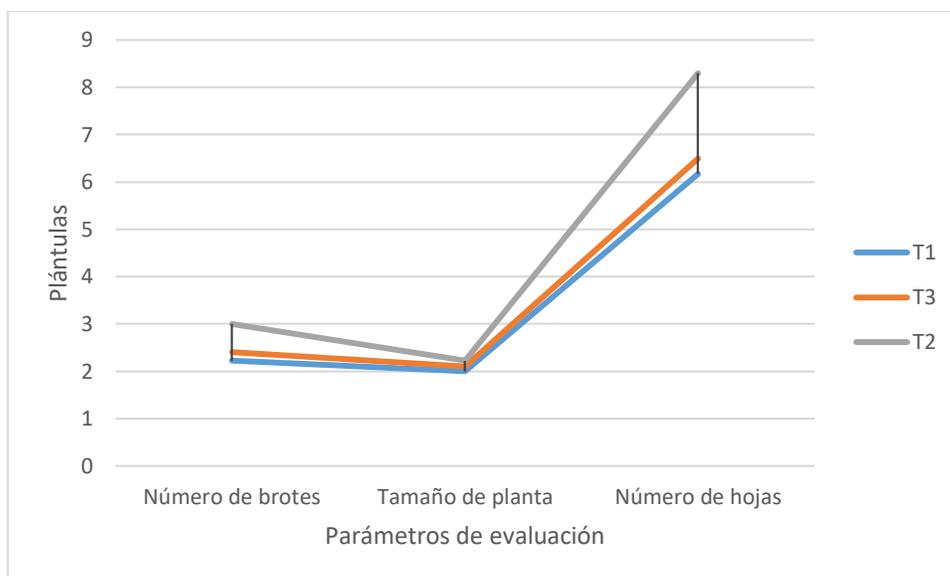


Figura 13 Plántulas vs parámetros de evaluación de los tratamientos (T1, T2 y T3) de la etapa de multiplicación de *Eryngium maritimum*.

Fuente: Tonato,L. (2020)

De los datos representados en la figura 13 se puede deducir que el medio con 75% de MS fue superior en todos los parámetros que los otros dos, siendo mucho más en el número de hojas, pero muy cercano en el tamaño de la planta, esto indicó que las plantas con mejores condiciones y en mayor número será producidas en este tipo de medio de multiplicación.

3.4. Enraizamiento

Tabla 12

Prueba de Fisher de los parámetros vs tratamientos (T1, T2, T3) utilizados en el enraizamiento de las plántulas de *Eryngium maritimum* cultivadas *in vitro*.

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	GL	Cuadrático promedio	F	Sig.
Modelo corregido	492,245	8	61,530625	60,7210115	0,000
interceptación	485,565	1	485,565	479,175987	0,000

Parámetros Evaluación	340,232	2	170,116	167,877632	0,000
Tratamientos	48,89	2	24,445	24,1233553	0,000
Parámetros*Tratamientos	103,124	4	25,781	25,4417763	0,000
Error	18,24	18	1,01333333		
Total	996,05	27			
Total corregido	510,485	26			

El análisis de Fischer demostró que en el proceso de enraizamiento se obtuvo diferencias significativas tanto con los tratamientos como con los parámetros evaluados, además de su interacción (Anexo 9), esto indica que un tratamiento será más efectivo y un factor será el predominante en esta etapa.

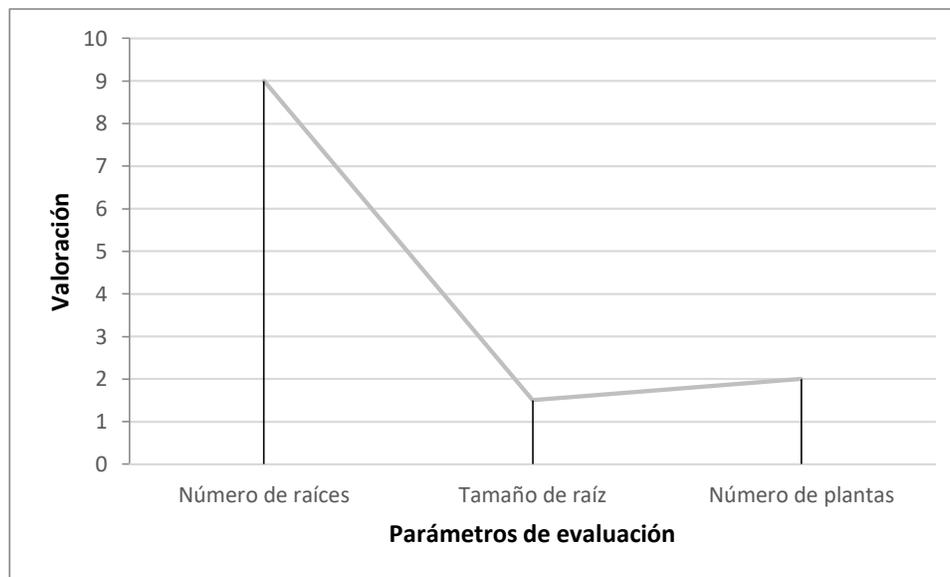


Figura 14 Valoración vs parámetros de evaluación de la etapa de multiplicación de *Eryngium maritimum*.
Fuente: Tonato, L. (2020)

En la figura 14 podemos observar que al comparar las medias marginales de cada parámetro estudiado se obtuvo que el rendimiento al número de raíces fue el

parámetro que mayor cantidad se obtuvo, mientras que el tamaño de la misma fue el de menor cantidad.

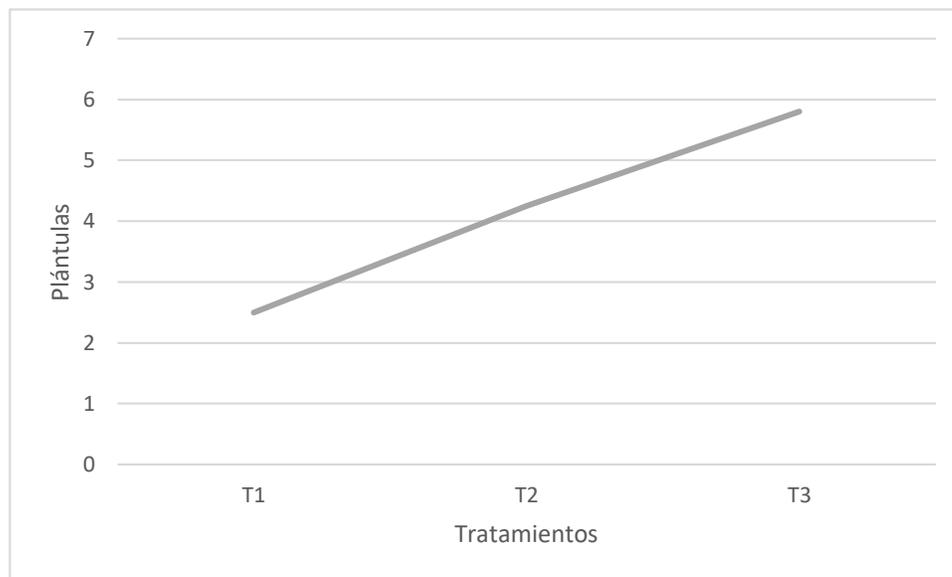


Figura 15 Plántulas vs tratamientos del enraizamiento para *Eryngium maritimum*.
Fuente: Tonato,L. (2020)

La figura 15 nos muestra que el mejor tratamiento es el que incorpora 0,1 ml de AIB y 0,5 ml de ANA, siendo el doble del medio que usa solo 0,5 ml de ANA y superior en un punto a la mezcla de 0,5 ml de AIB y 0,5 ml de ANA, estos reguladores de crecimiento promueven el crecimiento vegetal, pero es necesario que estén en las concentraciones adecuadas, de otra manera se inhibe el desarrollo tanto del individuo como del número de plántulas.

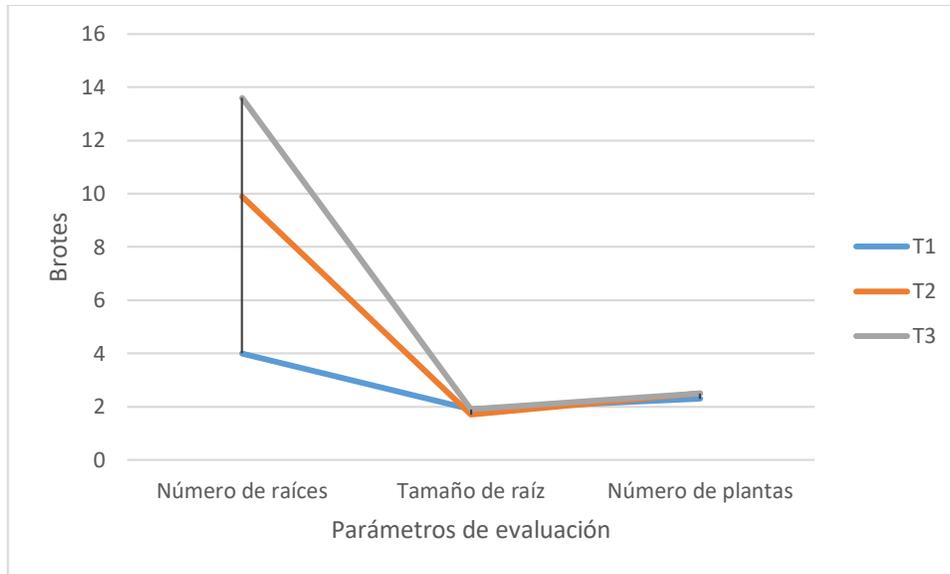


Figura 16 Plántulas vs Tratamientos de la etapa de enraizamiento de plántulas de *Eryngium maritimum* se obtuvo el promedio de plántulas en cada tratamiento (T1, T2, T3)
Fuente: Tonato,L. (2020)

Al comparar el efecto de los tratamientos en cada parámetro, se tiene un comportamiento distinto a lo observado en las fases anteriores, en introducción y multiplicación un tratamiento era superior a los otros en todos los aspectos, pero en este caso el número de raíces con T3 fue el más alto, mientras en el tamaño de la raíz es uno de los más bajos junto a T2, y estos dos vuelve a repuntar en el tamaño de la planta.

El presente análisis sumado a los anteriores, demuestran que el mejor tratamiento es el T3 que está compuesto por 0,1 ml de AIB y 0,5 ml de ANA, el mismo que permite obtener plantas con mejores características.

3.5. Discusión

El tratamiento del material vegetal en todas las etapas debe ser preciso y seguir un protocolo establecido, por ello, este trabajo se basó en establecer el protocolo para la multiplicación y establecimiento de brotes de *Eryngium maritimum* (Anexo 10),

debido a su importancia botánica y a los usos de la misma, lo que hace imprescindible la propagación de estas plantas.

La desinfección de las plantas fue el primer paso en este trabajo luego de recolectarlo, se estableció tres tratamientos a distinta concentración y tiempo de aplicación de cloro (Anexo 11). El cloro tiene la propiedad de oxidar a los componentes biológicos, lo que ocasiona que los microorganismos como hongos, bacterias, levaduras, entre otros mueran por perder electrones, reduciendo la presencia de estos microorganismos en las plantas madres (Ministerio de trabajo y asuntos sociales de España, 2009). Esta propiedad química genera la deshidratación y desnaturalización de las proteínas de la membrana celular y así se logra la lisis celular de los microorganismos, pero también genera efectos negativos en los brotes debido a que el hipoclorito de sodio no es específico y ataca tanto a los microorganismos como a los brotes (Talavera & Menendez, 2020), esto hace que se oxiden los brotes, llegando al punto de necrosis total, si bien se cumplió la reducción de microorganismos con muy pocos brotes contaminados con hongos y bacterias, el número de brotes que presentaron oxidación fue más alto, pero aun así menor que los brotes viables obtenidos; a pesar que se obtuvieron resultados positivos en la desinfección e introducción, en especial con el tratamiento T2 de concentración 3% de cloro por 12 minutos (Anexo 14), es necesario estudiar nuevos métodos de desinfección para reducir la oxidación, ya que no existe valores establecidos que puedan determinar el número máximo para plántulas contaminadas u con oxidación, por ello los individuos obtenidos tanto viables como no viables en este experimento no se pudieron comparar con un estándar, esto se evidencia en las distintas medias obtenidos en el trabajo de evaluación de métodos de cultivo in vitro por (Andrade, Córdoba, Criollo, & Lagos, 2013).

En la siguiente etapa después de establecer los pasos para la introducción (Anexo 12), los meristemos sembrados se desarrollan en un cuarto de cultivo (Anexo 15 y 16), con la problemática que las plantas obtenidas en esta etapa presentan vitrificación, si bien no se pudo analizar la causa de este fenómeno por la falta de recursos, se pudo inferir que esto fue causado por los azúcares del medio y las

temperaturas muy altas que se dieron en la ciudad de Ambato durante el trabajo, alcanzando temperaturas mayores a 25 °C lo que evaporó el agua del medio de cultivo dejando disponible más cantidad de agua para la planta (Anexo 17). Según (López, 2006), otros factores que pudieron influir en la vitrificación son exceso de factores nutricionales, elevada concentración de factores de crecimiento, deficiencia de luz, alta humedad relativa y potencial hídrico, por lo que es necesario estudiar más este fenómeno ocurrido en esta etapa ya que fue muy perjudicial para el número de plántulas obtenidas. Para eliminar este problema entre las soluciones que se pueden tomar están: reducir los azúcares del medio o controlar la temperatura con ventiladores en el cuarto, lo que se está realizando actualmente después de los resultados obtenidos, otra opción sería agregar sustancias anticongelantes para evitar la cristalización como etilenglicol; pero la solución que se usa en micropropagación es replantar los tejidos sanos en medios de cultivo limpios pero es un proceso que lleva mucho tiempo y recursos, por ello es necesario explorar las otras soluciones ya que se puede volver a producir por que las condiciones varían como menciona (Vargas & Abdelnour, 2010).

Para la etapa de multiplicación la concentración del medios MS es la variable que se evaluó, indicándonos que se requiere que tenga gran cantidad de sales pero no un exceso para que puedan aprovechar todo lo que ofrece el medio sin sufrir estrés, la principal razón para elegir este medio fue la presencia de amonio, nitrato y azúcares, lo que le da la mayoría de nutrientes para aumentar los brotes y así obtener clones estables; las fuentes de carbono y nitrógeno son las más importantes para las plantas en especial en este estado que no se tiene una alta tasa de fotosíntesis (Anexo 12), debido a sus condiciones establecidas en el proceso (Osorio & Gómez, 2008). Los parámetros de evaluación fueron: el tamaño de la planta, el número de brotes y el número de hojas, mismo que fueron analizados en esta etapa; siendo las elegidas las que tuvieron mayor número de hojas y brotes, la presencia de meristemas en las plantas características es mayor, favoreciendo la multiplicación, mientras que el tamaño de la planta es menor, ya que entre menos desarrollados estén, los tejidos no serán especializados y las células totipotentes podrán generar

varios individuos a partir de un solo brote; en cultivos *in vitro* de morera realizados por (Espinosa, Silva, Bahi, & Romero, 2019) se observó que las plantas con menor tamaño tuvieron una mayor tasa de supervivencia en etapas posteriores con 95% además de alcanzar un mayor desarrollo en las plantaciones del suelo, por lo que estas características fueron las óptimas para la etapa de introducción, el medio que dio los resultados con estas características fue el de 75% de concentración de MS.

En relación a la etapa previa para obtener plantas viables para aclimatación es el enraizamiento mediante un protocolo de establecimiento del proceso de obtención de plantas después de la multiplicación (Anexo 13), se requiere de promotores de crecimiento como lo son AIB (ácido indolbutírico), ANA (ácido naftalenacético) y AIA (ácido indolacético), en este caso se desarrolló raíces para que puedan adaptarse a la tierra de cultivo fuera del laboratorio, pero al igual que en la multiplicación un exceso o falta de estos compuestos genera distintos resultados en la planta, el objetivo de estas dos últimas etapas es obtener plantas con una gran cantidad de raíces secundarias pero con un tamaño pequeño, entre mayor número de raíces pequeñas existe mayor área de absorción de agua y minerales (Garro & Jimenez, 2018), ya que la presencia de pelos radiculares ayudan a cumplir esta función, lo cual se consiguió variando las concentraciones de ANA y AIB obteniéndose que el mejor tratamiento fue el que contenía 0,1 ml de AIB y 0,5 ml de ANA, en el cual se obtuvo el mayor número de raíces, siendo casi el doble de los demás tratamientos, el tamaño de la raíz fue bajo al igual que el tamaño de las plantas, por lo que se obtuvieron las características buscadas con este método. Al ser raíces pequeñas esto permite que se puedan aclimatar de mejor forma para el trasplante al suelo, al tener los resultados esperados el tratamiento elegido fue el que dio el menor tamaño, pero mayor número en raíces secundarias, sumado a lo que permite abarcar mayor área efectiva para absorber los nutrientes, estos resultados son similares a los obtenidos en cultivos *in vitro* realizados por (Ramírez, Seijo, Pérez, & Hurtado, 2012), este efecto se produce por el AIB que genera las

raíces pequeñas, además en la etapa de aclimatación las raíces aumentan su tamaño acompañado de la diferenciación celular.

Seguidamente de la obtención de las plantas con raíces es necesario aclimatarlas ya que estas no realizan la fotosíntesis y no tienen cubiertas de protección contra el ambiente, si se llevan a condiciones *ex vitro* morirían en poco tiempo, para ello se las lleva a condiciones controladas de estrés en las que comienzan a producir ceras como cubiertas cuticulares, empiezan a realizar la fotosíntesis, desarrollan sus estomas para el intercambio gaseoso y de agua entre la planta y el ambiente, esto se logra aplicando aumento en CO₂, irradiando con luz UV a los cultivos, reduciendo la cantidad de agua, entre otras acciones, este proceso toma mucho tiempo hasta que se obtengan las plantas con las mejores condiciones, para posteriormente llevarlas a los cultivos en invernaderos o en suelo, (Gil, López, & López, 2017).

3.6. Comprobación de la hipótesis

Al obtener plantas de *Eryngium maritimum* viables luego del proceso de micropropagación se comprueba que, si es posible obtener individuos viables y genéticamente estables a partir de una planta madre, además con las pruebas de Fisher en cada etapa se comprobó que las diferencias entre tratamientos fueron significativas rechazando la hipótesis nula y aceptando la alternativa.

CAPÍTULO IV

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

Se estableció un protocolo de 6 etapas (selección, limpieza, desinfección, introducción, multiplicación y enraizamiento) con los tratamientos detallados en cada una de ellas para conseguir plantas genéticamente estables mediante micropropagación *in vitro* de *Eryngium maritimum*.

Se experimentó 3 tratamientos distintos de desinfección, 2 de introducción, 3 de multiplicación y 3 de enraizamiento para los brotes meristemáticos de *Eryngium maritimum* que sirvieron para establecer un protocolo con las mejores condiciones de crecimiento y de micropropagación.

Se definió que para introducir explantes de *Eryngium maritimum* es necesario sembrar los meristemas en un medio con 100% de medio Murashige Skoog (MS), 1 ml/l de BAP, 0,1 ml/l de AIB, 30 g/l de sacarosa, 7 g/l de agar y un pH de 5,8 con ciclos de luz: oscuridad de 16:8 horas a 23°C por 30 días, en estas condiciones se desarrollarán brotes viables que pueden ser utilizados en las siguientes etapas de micropropagación.

Se determinó que el medio de cultivo que mejores resultados dio en la multiplicación de *Eryngium maritimum* fue el que tuvo 75% de medio Murashige Skoog (MS), 1 ml/l de BAP, 0,1 ml/l de AIB, 30 g/l de sacarosa, 6,9 g/l de agar y un pH de 5,7 con ciclos de luz: oscuridad de 16:8 horas a 23°C por 30 días, a pesar que en este procedimiento se originó vitrificación que disminuyó gran parte de los individuos que iniciaron la etapa, estas condiciones fueron las que mayor rendimiento y mejores características de plantas originaron.

Se estabilizó un medio de cultivo formado por 100% de medio Murashige Skoog

(MS), 0,1 ml de BAP, 0,1 ml/l de AIB, 0,5 ml/l de ANA, 30 g de sacarosa, 7 g/l de agar y un pH de 5,7; en el que se obtuvieron plantas con mayor número de raíces, con el menor tamaño de raíces y un tamaño de planta bajo siendo las mejores características de los tres tratamientos aplicados y siendo óptimas para un trasplante posterior a tierra de cultivo.

4.2. Recomendaciones

Al finalizar esta investigación considero importante exponer algunas temáticas abiertas a la indagación, de cara a futuras investigaciones que pudieran complementar este estudio.

Estudios acerca del origen de la vitrificación en el medio de multiplicación para identificar si es la sacarosa usada en el medio la que interfiere en este fenómeno o es otra variable.

Estudios para evaluar el comportamiento de otras especies de género *Eryngium* frente a este protocolo de micropropagación y así encontrar debilidades y fortalezas del mismo para mejorarlo.

Estudios para evaluar el comportamiento y la estabilidad en el cultivo en invernadero de los individuos generados por micropropagación para mejorar la estabilidad y eficiencia de este método usado en *Eryngium maritimum*.

Estudios sobre nuevos métodos de desinfección que sean menos perjudiciales para los brotes, ya que la oxidación puede representar pérdidas económicas en protocolos estandarizados que usen soluciones de cloro como principal método de desinfección.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albarrán, J., Fuenmayor, F., & Fuchs, M. (2013). Propagación Clonal Rápida de Variedades Comerciales de Yuca Mediante Técnicas Biotecnológicas. *Ceniap*, 89-95.
- Alcántara, J., & Godoy, A. (2019). Principales reguladores hormonales y sus interacciones en el crecimiento personal. *Nova*, 17(32), 109-129.
- Andrade, D., Córdoba, M., Criollo, H., & Lagos, T. (2013). Evaluación de medios de cultivo para propagación in vitro de semillas y explantes de especies silvestres de Solanum. *Acta Agronómica*, 62(1), 27-36.
- Báez-Pérez, A., González-Molina, L. S., Bautista-Cruz, A., & M, B.-A. (2015). Efecto de la aplicación del ácido indol-3-butírico en la producción y calidad de trigo (*Triticum aestivum* L.). *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 3(6), 523-537.
- Bedoya, J., Yaneth, C., & Milena, S. (2016). Estandarización De Un Protocolo De Desinfección Y Establecimiento De Cultivo In Vitro De Aloysia Tryphilla. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 14(2), 38-46.
- Bonilla, M., Pajares, S., & Viguera, J. (2016). *Manual de practicas de microbiología básica*. Cuajimalpa: UAM.
- Calva, G., & Pérez, J. (2005). Cultivo de células y tejidos vegetales. *Digital Universitaria*, 2-16.
- Carhuaricra, K., & Oliveira, J. (2012). Introducción y multiplicación in vitro del cultivo de ajo variedad. *Peruana de Biología*, 341-344.
- Casas, A. (2010). Multiplicación in vitro en remolacha azucarera. *Aula Dei*, 18(1), 51-56.

- Espinosa, A., Silva, J., Bahi, M., & Romero, D. (2019). Influencia del tamaño de las plantas in vitro y tipo de sustrato en la aclimatación de *Morus alba* L. *Pastos y Forrajes*, 42(1), 225-229.
- FAO. (2015). *What we get from food*. Vancouver: NFSLBC.
- Gabius, H., Siebert, H., Andre, S., Jimenez, J., & Rudiger, H. (2004). Chemical Biology of the Sugar Code. *ChemBioChem*, 5(6), 740-764.
- García, D., Mesa, N., & Ocampo, M. (2015). Estandarización del protocolo de desinfección para la micropropagación de *Aspidosperma polyneuron*. *Colombiana de Biotecnología*, 17(2), 76-84.
- Garro, G., & Jimenez, K. (2018). Desarrollo de un sistema de cultivo in vitro de raíces pilosas de *Phyllanthus acumminatus*, para la producción de compuestos con actividad biológica. *Tecnología en Marcha*, 33-36.
- Gepts, P. (2006). Plant genetic resources conservation and utilization: the accomplishments and. *Crop Sci*, 46, 2278-2292.
- Gil, A., López, S., & López, A. (2017). Aclimatación de plántulas in vitro de *Saintpaulia ionantha* H. Wendl. (Gesneriaceae) “violeta africana” a condiciones de invernadero. *Arnaldoa*, 24(1), 343 - 350.
- Gisbert, C., & Picó, M. (2017). *Micropropagación*. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia.
- Irondo, J. (2001). Conservación de germoplasma de especies raras y amenazadas. *Investigación Agrícola*, 16(1), 6-18.
- Jimenez, A. (2017). *Proceso De Establecimiento In Vitro De Explantes De Cedrela Odorata* L. Manabí: Bioplantas.
- Jimenez, F., & Agramonte, D. (2013). Cultivo in vitro y macropropagación como vía de sostenibilidad. *Biotecnología Vegetal*, 3 - 21.

- Khoshbakht, K., Hammer, K., & Pistrick, K. (2007). *Eryngium caucasicum* Trautv. cultivated as a vegetable. *Genetic Resources and Crop Evolution*.
- Kumar, M., Branton, A., & Trivedi, D. (2018). Physical, Thermal, and Spectroscopic Characterization of Biofield Energy Treated Murashige and Skoog Plant Cell Culture Media. *Sciences du Vivant*, 25-29.
- López, C. (2006). Vitrificación de plantas cultivadas in vitro. *Encuentros en la Biología*, 34-49.
- Martin, D. (2012). Sustancias utilizadas como agente gelificante alternativas al agar en medios de cultivo para propagación in vitro. *Investigación agraria y ambiental*, 3(2), 49-62.
- Megías, M., Molist, P., & Pombal, M. (2020). Tejidos vegetales Meristemas. *Facultad de Biología. Universidad de Vigo*, 1-21.
- Ministerio de trabajo y asuntos sociales de España. (2009). *NTP 429: Desinfectantes: características y usos más corrientes*. Madrid: INTSH.
- Morales, L. (2012). Interés terapéutico de *Eryngium* (cardo corredor) en oncología. *Revista Médica de Homeopatía*, 5(1), 18-21.
- Ochoa, M., Rivera, L., & Gómez, J. (2016). Método de selección en explantes in vitro de *Opuntia* sps con resistencia a la mancha negra causada por *Pseudocercospora opuntiae*. *Facultad de Ciencias Agrarias*, 48(1), 21-31.
- Olmos, S., Echenique, V., & Rubinstein, C. (2010). Micropropagación. En S. Olmos, V. Echenique, & C. Rubinstein, *Biotechnología y Mejoramiento Vegetal II* (págs. 353-362). Buenos Aires: INTA.
- Osorio, A., & Gómez, N. (2008). Evaluación de diferentes fuentes de carbono y de nitrógeno para la producción de renina a partir del moho *Mucor miehei*. *Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquía*, 17-26.

- Ramírez, Y., Seijo, M., Pérez, B., & Hurtado, O. (2012). Efecto del AIB y el TDZ en el enraizamiento in vitro de plantas de *Bambusa vulgaris* var *vulgaris* Schrad. ex Wend. *Colombiana de Biotecnología*, 13(1), 200-207.
- Roca, W., & Mroginski, L. (1993). *Cultivo de Tejidos en la Agricultura*. Bogotá: Centro Internacional de Agricultura Tropical.
- Rodríguez, A., S, Q., & Torres, M. (2004). Influencia De Los Medios De Cultivo En La Micropropagación De Plátano (*Musa Spp.*). *Cultivos Tropicales*, 25(1), 23-26.
- Rodríguez, M., & Chacón, M. (2014). Efecto de la concentración y de los componentes del medio de cultivo MS sobre la. *Bosque*, 35(1), 199-122.
- Rojas, C., & Cuzquén, C. (2014). Propagación clonal in vitro y enraizamiento de estacas. 312-320.
- Rojas, L., & Usubillaga, A. (2004). Composition of the Essential Oil from the Leaves of *Eryngium foetidum* L. from the Venezuelan Andes. *Journal of Essential Oil Research*, 33-34.
- Rojas, R., & Gomez, E. (2020). Vitaminas. *FARMACOLOGÍA MÉDICA*, 15-20.
- Salazar, A., Amaya, A., & Barrientos, F. (2013). Evaluación de diferentes medios de cultivo in vitro en el desarrollo. *Colombiana de Biotecnología*, 15(2), 97-105.
- Talavera, I., & Menendez, A. (2020). Una explicación desde la química: ¿por qué son efectivos el agua y jabón, el hipoclorito de sodio y el alcohol para prevenir el contagio con la COVID-19? *Anales de la Academia de Ciencias de Cuba*, 10(2), 28-30.
- Vargas, M., & Abdelnour, A. (2010). Cultivo in vitro de *Geophila macropoda* (Ruiz & Pav. DC) a partir de embriones cigóticos. *Agronomía Mesoamericana*, 21-29.
- Vences, C. (2016). *Micropropagación Vegetal*. México DF: UAEM.

Villavicencia, C. (2012). Micropropagación de *Epithelantha micromeris* (Engelm.).
Mexicana de Ciencia, 3(14), 84-112.

ANEXOS

Anexo 1 Factores inter sujetos de los parámetros de evaluación y tratamientos de la etapa de desinfección de la planta madre de *Eryngium*

	Etiqueta de valor	N
Parámetros evaluación	1 Hongo	9
	2 Bacteria	9
	3 Oxidación potencial	9
	4 Oxidación muertos	9
	5 Viables	9
Tratamientos	1 T1 5% cloro 5 min	15
	2 T2 3% cloro 12 min	15
	3 T3 3% cloro 15 min	15

Anexo 2 Estadísticos descriptivos (media y desviación) de los parámetros de evaluación en cada tratamiento de desinfección

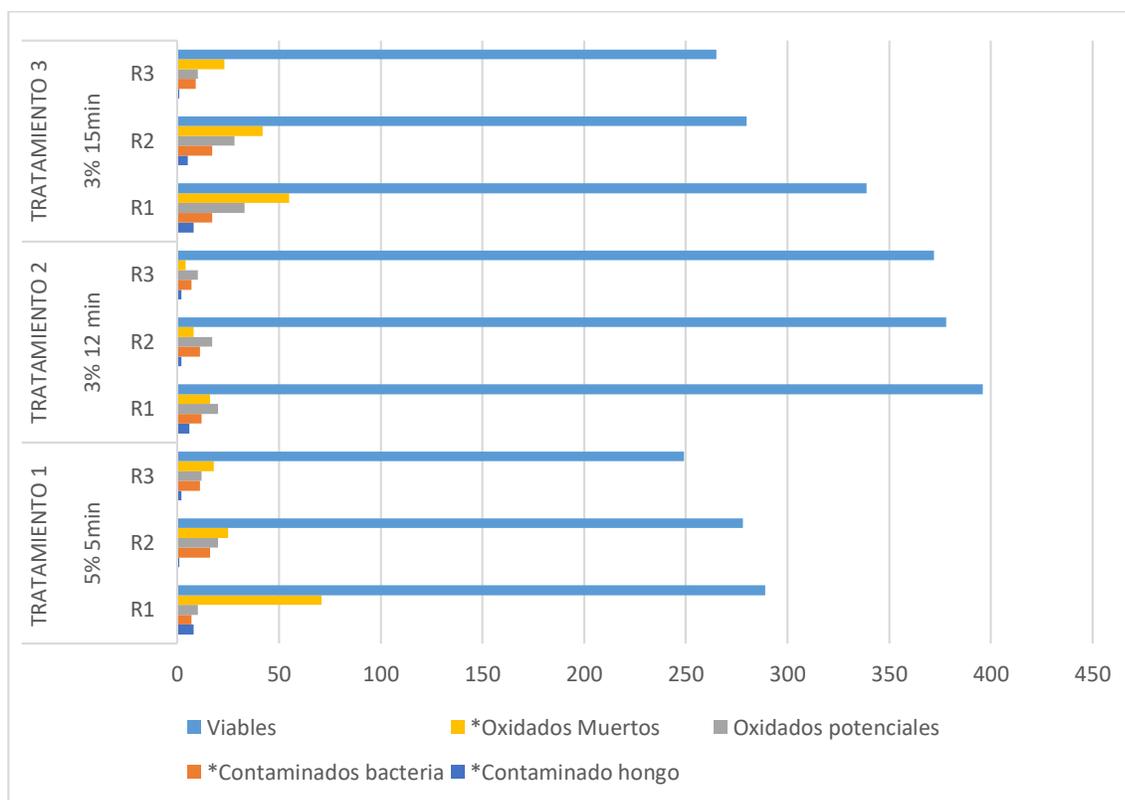
Parámetros evaluación	Tratamientos	Media	Desviación estándar	N
Hongo	T1 5% cloro 5 min	3,67	3,786	3
	T2 3% cloro 12 min	3,33	2,309	3
	T3 3% cloro 15 min	4,67	3,512	3
	Total	3,89	2,892	9

Bacteria	T1 5% cloro 5 min	11,33	4,509	3
	T2 3% cloro 12 min	10	2,646	3
	T3 3% cloro 15 min	14,33	4,619	3
	Total	11,89	3,983	9
Oxidación potencial	T1 5% cloro 5 min	14	5,292	3
	T2 3% cloro 12 min	15,67	5,132	3
	T3 3% cloro 15 min	23,67	12,097	3
	Total	17,78	8,378	9
Oxidación muertos	T1 5% cloro 5 min	38	28,792	3
	T2 3% cloro 12 min	9,33	6,11	3
	T3 3% cloro 15 min	40	16,093	3
	Total	29,11	22,408	9
Viables	T1 5% cloro 5 min	272	20,665	3
	T2 3% cloro 12 min	382	12,49	3
	T3 3% cloro 15 min	294,67	39,119	3
	Total	316,22	55,303	9
Total	T1 5% cloro 5 min	67,8	107,232	3
	T2 3% cloro 12 min	85,07	154,356	3
	T3 3% cloro 15 min	75,47	115,313	3
	Total	75,78	124,562	9

Anexo 3 Relación entre los parámetros de evaluación y los tratamientos de la desinfección de la planta madre de *Eryngium*

Parámetros evaluación	Tratamientos	Media	Desviación estándar	Límite inferior	Límite superior
Hongo	T1 5% cloro 5 min	3,67	8,844	-14,396	21,729
	T2 3% cloro 12 min	3,33	8,844	-14,729	21,396
	T3 3% cloro 15 min	4,67	8,844	-13,396	22,729
Bacteria	T1 5% cloro 5 min	11,33	8,844	-6,729	29,396
	T2 3% cloro 12 min	10	8,844	-8,063	28,063
	T3 3% cloro 15 min	14,33	8,844	-3,729	32,396
Oxidación potencial	T1 5% cloro 5 min	14	8,844	-4,063	32,063
	T2 3% cloro 12 min	15,67	8,844	-2,396	33,729
	T3 3% cloro 15 min	23,67	8,844	5,604	41,729
Oxidación muertos	T1 5% cloro 5 min	38	8,844	19,937	56,063
	T2 3% cloro 12 min	9,33	8,844	-8,729	27,396
	T3 3% cloro 15 min	40	8,844	21,937	58,063
Viabiles	T1 5% cloro 5 min	272	8,844	253,937	290,063
	T2 3% cloro 12 min	382	8,844	363,937	400,063
	T3 3% cloro 15 min	294,67	8,844	276,604	312,729

Anexo 4 Medias de brotes obtenidos contaminados, viables y oxidados por los distintos tratamientos de desinfección de planta madre de *Eryngium*



Anexo 5 Estadísticos descriptivos (media y desviación) de los parámetros de evaluación en cada tratamiento de introducción

Parámetros evaluación	Tratamientos	Media	Desviación estándar	N
Hongo	BAP 1ml	0	0	3
	BAP 2 ml	1,67	0,577	3
	Total	0,83	0,983	6
Bacteria	BAP 1ml	4	1	3
	BAP 2 ml	5	1,732	3
	Total	4,5	1,378	6

Oxidación potencial	BAP 1ml	3,67	0,577	3
	BAP 2 ml	7	1	3
	Total	5,33	1,966	6
Oxidación muertos	BAP 1ml	5,33	2,887	3
	BAP 2 ml	9,67	7,095	3
	Total	7,5	5,394	6
Viables	BAP 1ml	178,67	23,714	3
	BAP 2 ml	116,67	43,616	3
	Total	147,67	46,25	6
Total	BAP 1ml	38,33	73,213	15
	BAP 2 ml	28	48,915	15
	Total	33,17	61,403	30

Anexo 6 Relación entre los parámetros de evaluación y los tratamientos de introducción de brotes de *Eryngium*

Parámetros evaluación	Tratamientos	Media	Error Estándar	Límite inferior	Límite superior
Hongo	BAP 1ml	0	9,182	-19,152	19,152
	BAP 2 ml	1,67	9,182	-17,486	20,819
Bacteria	BAP 1ml	4	9,182	-15,152	23,152
	BAP 2 ml	5	9,182	-14,152	24,152
Oxidación potencial	BAP 1ml	3,67	9,182	-15,486	22,819
	BAP 2 ml	7	9,182	-12,152	25,152

Oxidación muertos	BAP 1ml	5,33	9,182	-13,819	24,486
	BAP 2 ml	9,67	9,182	-9,486	28,819
Viabiles	BAP 1ml	178,67	9,182	159,514	197,819
	BAP 2 ml	116,67	9,182	97,514	135,819

Anexo 4 Correlaciones múltiples entre los parámetros de evaluación de la multiplicación de brotes de *Eryngium*

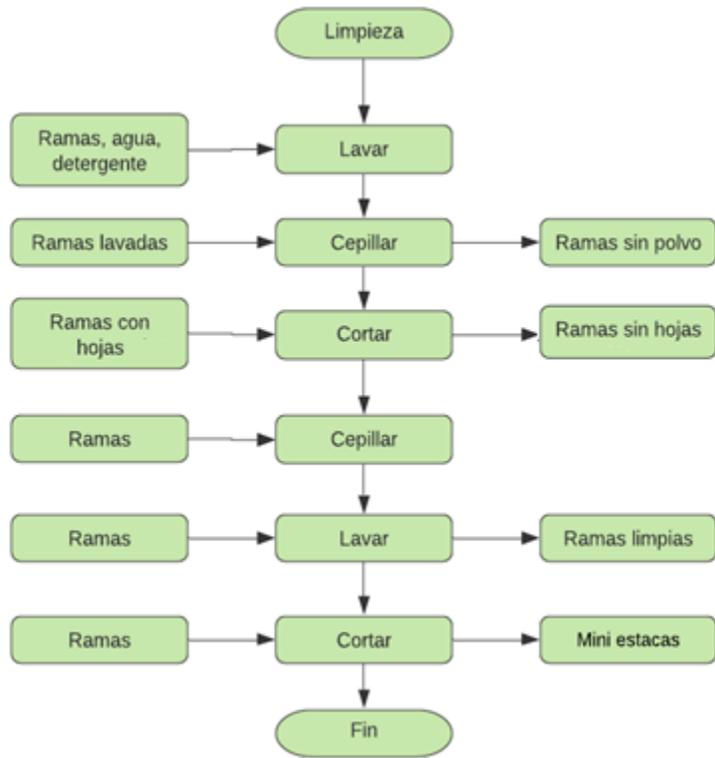
Parámetros evaluación	Tratamientos	Media	Desviación estándar	Sig.	Límite inferior	Límite superior
Número de brotes	Tamaño de plantas	0,6222	0,27457	0,087	-0,785	1,323
	Número de hojas	-4,8333	0,27457	0	-5,5341	-4,1326
Tamaño de plantas	Número de brotes	-0,6222	0,27457	0,087	-1,323	0,785
	Número de hojas	-5,4556	0,27457	0	-6,1563	-4,7548
Número de hojas	Número de brotes	4,8333	0,27457	0	4,1326	5,5341
	Tamaño de plantas	5,4556	0,27457	0	4,7548	6,1563

Anexo 5 Correlaciones múltiples entre los tratamientos usados en la multiplicación de brotes de *Eryngium*

Parámetros evaluación	Tratamientos	Media	Desviación estándar	Sig.	Límite inferior	Límite superior
100% MS	75% MS	-1	0,27457	0,005	-1,7008	-0,2992

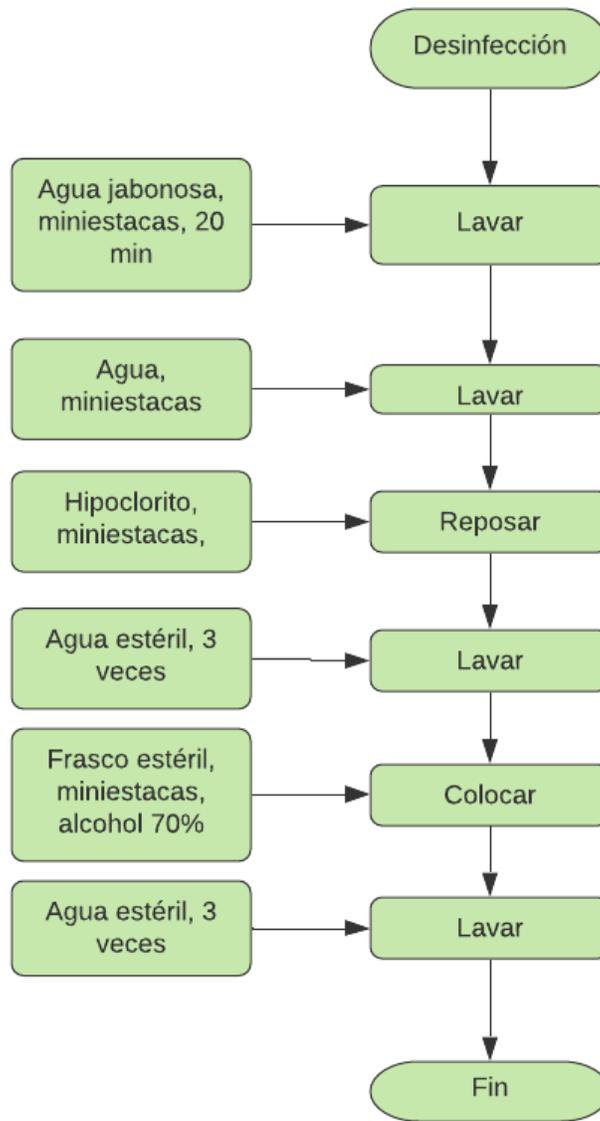
	50% MS	-0,3778	0,27457	0,347	-1,0785	0,323
75% MS	100% MS	1	0,27457	0,005	0,2992	1,7008
	50% MS	0,6222	0,27457	0,087	-0,785	1,323
50% MS	100% MS	0,3778	0,27457	0,374	-0,323	1,0785
	75% MS	-0,6222	0,27457	0,087	-1,323	0,0785

Anexo 6 Protocolo de limpieza del material vegetal



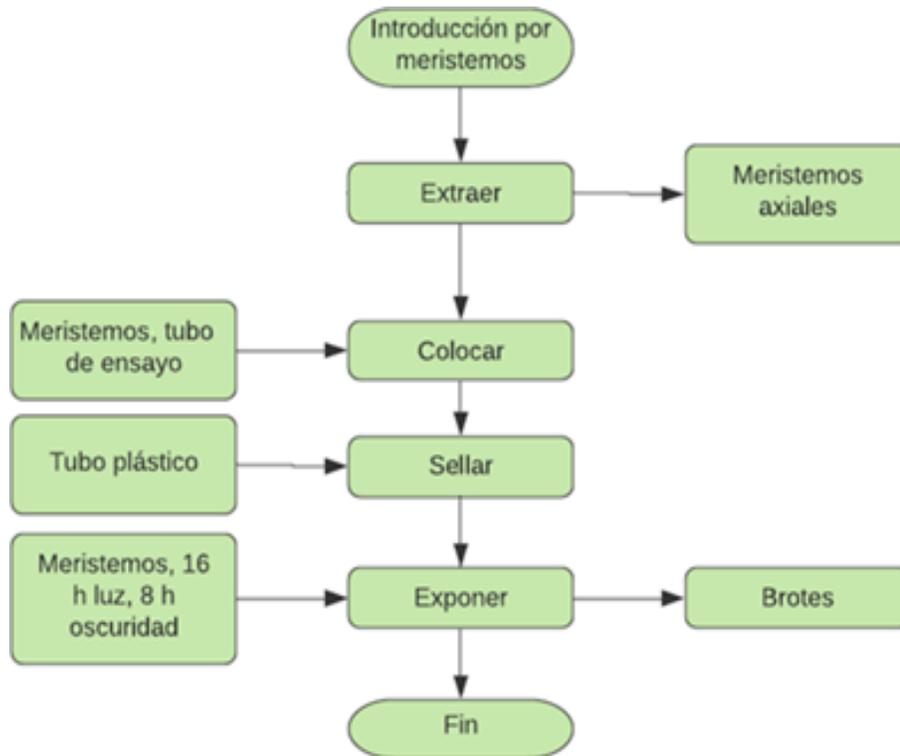
Se establece las acciones, materia prima y productos necesarios para la limpieza del material vegetal (*Eryngium*).

Anexo 7 Protocolo de desinfección de planta madre



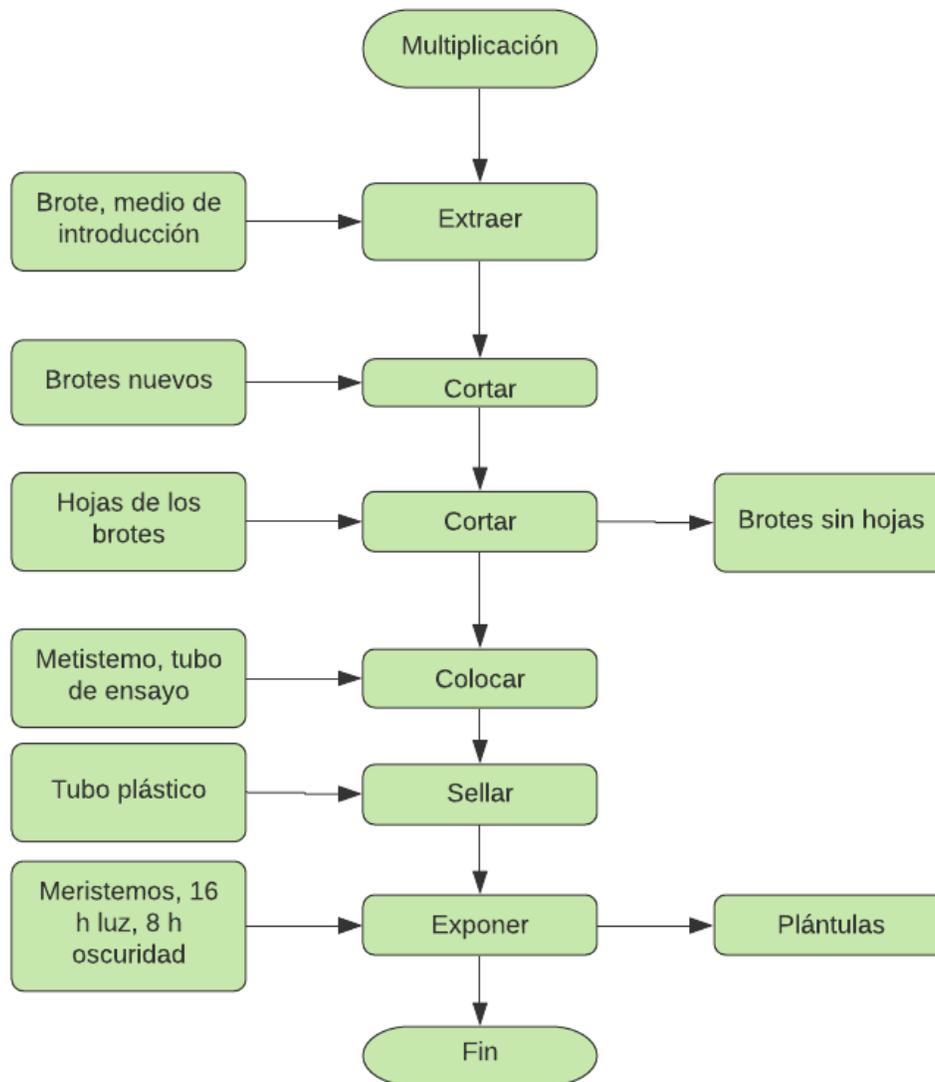
Se establece los pasos a realizar para desinfectar las estacas obtenidas de la planta madre de *Eryngium* y su posterior uso en cultivo *in vitro*

Anexo 8 Protocolo de introducción de meristemos



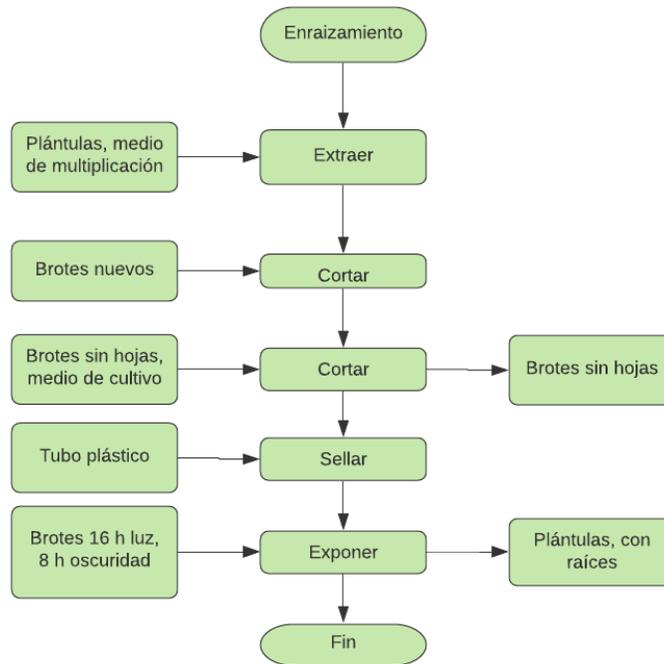
Se establece los pasos para realizar la introducción de brotes obtenidos en la desinfección en el medio de cultivo y así iniciar el cultivo *in vitro*

Anexo 9 Protocolo de multiplicación de brotes



Se establece las condiciones para multiplicar los brotes obtenidos en la etapa de introducción.

Anexo 103 Protocolo de enraizamiento



Se establece el procedimiento para generar raíces en las plántulas obtenidas en la multiplicación y que estén listas para su aclimatación.

Anexo 11 Proceso de desinfección de estacas



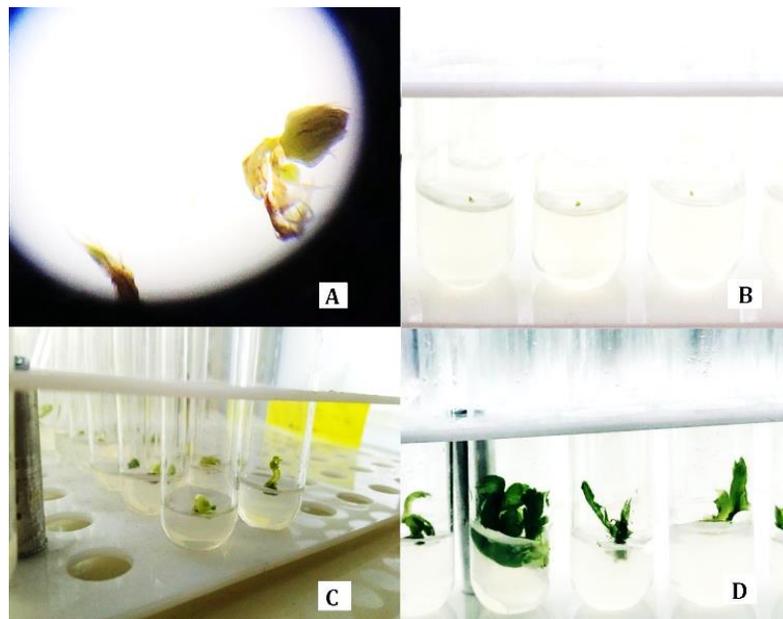
Tres tratamientos de cloro con variación del tiempo (T1 5% cloro 5 min, T2 3% cloro 12 min, T3 3% cloro 15 min)

Anexo 12 Proceso de secado



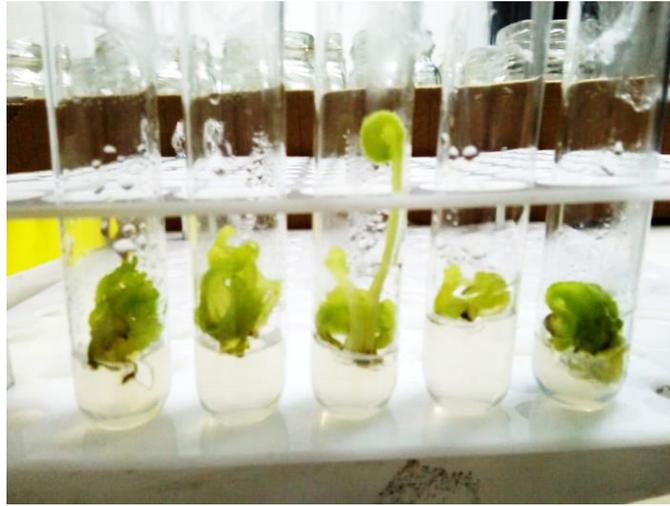
estacas en la cámara de flujo laminar para el posterior corte de meristemas

Anexo 13 Etapa de introducción



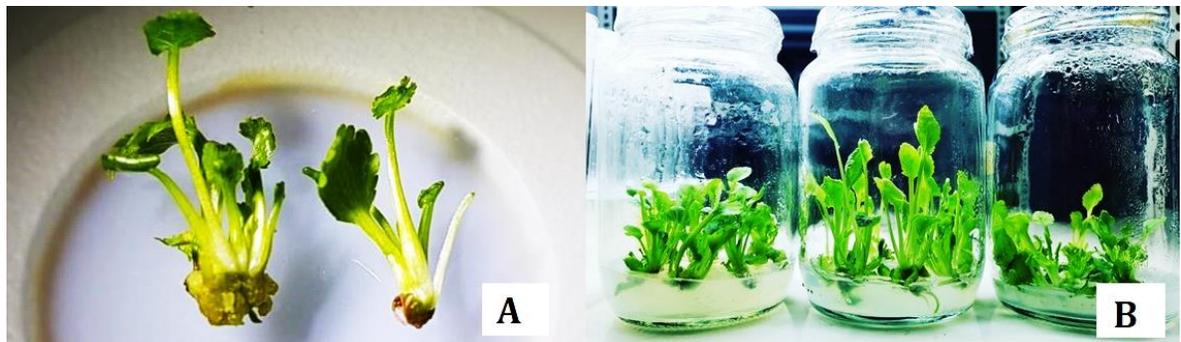
A.- Observación en el estereoscopio el meristemo. B.- Meristemas de *Eryngium maritimum* sembrados en medio de cultivo (T1 BAP 1ml, T2 BAP 2ml) 1 día, C.- Meristemo en desarrollo de 7 días. D.- Meristemas en desarrollo de 21 día.

Anexo 14 Vitrificación



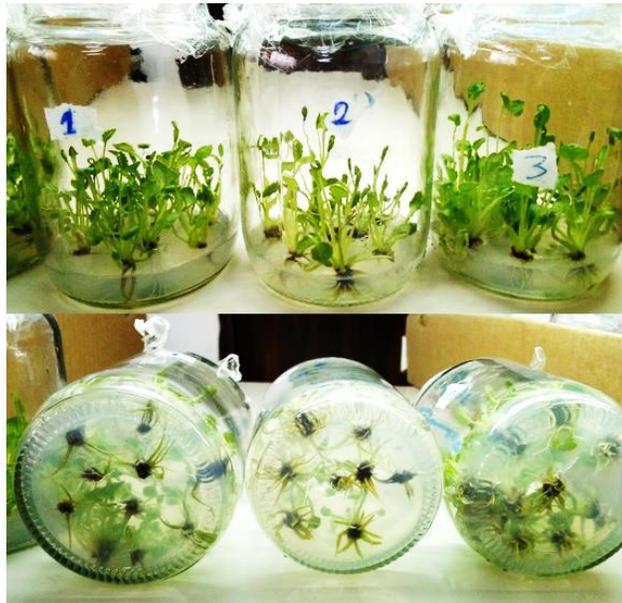
Vitrificación en el día 30 del proceso de introducción

Anexo 15 Etapa de multiplicación



A.- Plántulas en el proceso de multiplicación de *Eryngium maritimum* de B.- *Eryngium maritimum* sembrados en medio de cultivo (T1 100% MS 7g/L Agar, T2 75% MS 6,9g/L Agar, T3 50% MS 6,9g/L Agar)

Anexo 16 Etapa de enraizamiento



Enraizamiento de *Eryngium maritimum*, sembrados en medio de cultivo (T1 BAP 0,1ml – ANA 0,5ml, T2 BAP 0,1ml - AIB 0,5 ml – ANA 0,5 ml, T3 BAP 0,1 ml – AIB 0,1 ml – ANA 0,5 ml)

Anexo 17 Etapa de aclimatación



Eryngium maritimum, en la florícola FLOWER VILLAGE CIA. LTDA