



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**Estandarización de un protocolo de propagación *in vitro* para *Eryngium "Blue"*
empleando un sistema de inmersión temporal tipo BIT en el Laboratorio de Cultivo de
Tejidos de Flores del Valle S.A. Valleflor**

Naranjo López, María Daniela

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología

Jadán Guerrero, Mónica Beatriz, Ph.D

02 de febrero de 2023

2/2/23, 11:09

Proyecto de Titulación

Informe de originalidad

NOMBRE DEL CURSO

Proyecto de Titulación SII OCT 22 - MAR 23

NOMBRE DEL ALUMNO

MARIA DANIELA NARANJO LOPEZ

NOMBRE DEL ARCHIVO

MARIA DANIELA NARANJO LOPEZ - Documento sin título

SE HA CREADO EL INFORME

2 feb 2023

Resumen

Fragmentos marcados	0	0 %
Fragmentos citados o entrecomillados	0	0 %





Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Certificación

Certifico que el trabajo de titulación: **“Estandarización de un protocolo de propagación *in vitro* para *Eryngium “Blue”* empleando un sistema de inmersión temporal tipo BIT en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos de Flores del Valle S.A. Valleflor”** fue realizado por la señorita **Naranjo López, María Daniela**; el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Sangolquí, 02 de febrero de 2023

.....
Jadán Guerrero, Mónica Beatriz Ph.D.
C.I.: 1802278562



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Responsabilidad de Autoría

Yo, **Naranjo López, María Daniela**, con cédula de ciudadanía nº 1721441051, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **“Estandarización de un protocolo de propagación *in vitro* para *Eryngium “Blue”* empleando un sistema de inmersión temporal tipo BIT en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos de Flores del Valle S.A. Valleflor”** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 02 de febrero de 2023

Naranjo López, María Daniela
C.C.: 1721441051



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Autorización de Publicación

Yo, **Naranjo López, María Daniela** con cédula de ciudadanía n° 1721441051, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **“Estandarización de un protocolo de propagación *in vitro* para *Eryngium “Blue”* empleando un sistema de inmersión temporal tipo BIT en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos de Flores del Valle S.A. Valleflor”** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi/nuestra responsabilidad.

Sangolquí, 02 de febrero de 2023

Naranjo López, María Daniela
C.C.: 1721441051

Dedicatoria

A Dios,

Por ser mi guía y fortaleza a lo largo de mi existencia, gracias por ser mi apoyo en momentos de dificultad.

A mis padres, Pablo y Paulina,

Por su amor, trabajo y sacrificio en todos estos años, gracias por el apoyo incondicional y los valores inculcados que me han permitido alcanzar esta meta académica. Este triunfo que he alcanzado también es de ustedes, es un orgullo y privilegio ser su hija.

A mis hermanas,

Por su presencia, respaldo y cariño durante este camino, gracias por estar conmigo en todo momento.

A mis amigos,

Por los risas y aventuras, gracias por haberme permitido cursar este camino a su lado y poder llamarlos amigos.

María Daniela Naranjo López

Agradecimiento

A Dios por haberme dado la vida y permitirme el haber llegado hasta este momento tan importante en mi formación profesional. Gracias por ser mi fortaleza y sustento en cada etapa de mi vida.

A mis padres Pablo y Paulina, y mis hermanas Monse, Pame y Adri, gracias por ser el pilar más importante en mi vida, por siempre darme su amor, apoyo, aliento y nunca abandonarme. Gracias por ser mi ejemplo profesional y personal, este triunfo no lo hubiera logrado sin ustedes.

A la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE por su acogida, a todos los docentes que conforman Biotecnología, por el valioso conocimiento inculcado para formarme como profesional. A la Dr. Mónica Jadán por haberme brindado la oportunidad de recurrir a su conocimiento científico y por haberme brindado sus palabras de aliento.

Agradezco a Flores del Valle S.A Valleflor, especialmente a la Ing. Rosalía Paladines, quién hizo que el desarrollo de mi investigación fuera un éxito y sobre todo la confianza brindada para empezar mi formación profesional bajo su guía y enseñanza.

Y para finalizar, a mis amigos de vida Dani y Meli, gracias por escucharme y compartir conmigo todas sus experiencias, y haberme acompañarme durante mi vida universitaria. Y, sobre todo, quiero agradecer a los amigos que la carrera me permitió conocer, Mery, Mirla y Alex, gracias por las risas, aventuras y sobre todo por el apoyo, su compañía hizo que este camino sea ameno.

Gracias, todo esto fue posible por ustedes.

María Daniela Naranjo López

Índice de contenidos

Resultado de análisis Google Assignments.....	2
Certificación	3
Responsabilidad de Autoría	4
Autorización de Publicación	5
Dedicatoria	6
Agradecimiento.....	7
Resumen.....	15
Abstract.....	16
Capítulo I: Introducción.....	17
Antecedentes	17
Justificación del problema	18
Planteamiento del problema.....	19
Objetivos	20
<i>Objetivo General</i>	20
<i>Objetivos Específicos</i>	20
Hipótesis	20
Capítulo II: Marco teórico.....	21

Descripción de la especie.....	21
<i>Descripción Botánica</i>	21
<i>Taxonomía</i>	21
<i>Distribución Geográfica</i>	23
<i>Uso y propiedades</i>	23
<i>Establecimiento in vitro</i>	24
Cultivo de tejido vegetales.....	25
<i>Generalidades</i>	25
<i>Micropropagación a través de explantes con meristemos pre existentes</i>	26
Sistema de Inmersión Temporal.....	31
<i>Generalidades</i>	31
<i>Sistema de Inmersión tipo RITA</i>	31
<i>Sistema de Inmersión Temporal tipo BIT</i>	32
<i>Biorreactor Modular de Inmersión Temporal (BioMINT)</i>	33
<i>Ventajas del Sistema de Inmersión Temporal</i>	34
Capítulo III: Metodología.....	36
Ubicación del lugar de investigación	36
Material Experimental	37

	10
Métodos	37
<i>Recolección del material vegetal</i>	37
<i>Establecimiento de Eryngium “Blue”</i>	38
<i>Acondicionamiento del Sistema de Inmersión Temporal</i>	40
<i>Desinfección del Sistema de Inmersión Temporal</i>	41
<i>Prueba de contaminación</i>	42
<i>Tratamientos</i>	42
<i>Tipo de Diseño Experimental</i>	43
<i>Variables a medir</i>	43
Capítulo IV: Resultados	45
Efecto de los tratamientos en la tasa de multiplicación	45
Efecto de los tratamientos en la masa	47
Efecto de los tratamientos en la calidad de los brotes.....	48
Comparación de la tasa de multiplicación por el método convencional y método experimental	52
Capítulo V: Discusión	55
Conclusiones.....	59
Recomendaciones	59

Bibliografía 61

Apéndices 68

Índice de tablas

Tabla 1 <i>Clasificación taxonómica del género Eryngium L</i>	22
Tabla 2 <i>Tiempos y Frecuencias de Inmersión evaluados en el sistema de Inmersión Temporal</i>	42
Tabla 3 <i>Evaluación de los parámetros de calidad de los brotes obtenidos de Eryngium “Blue” al finalizar un ciclo de propagación en el SIT.</i>	49

Índice de figuras

Figura 1 <i>Esquema de los métodos de propagación in vitro de diferentes explantes</i>	26
Figura 2 <i>Esquema de micropropagación a través de explantes pre-existentes</i>	27
Figura 3 <i>Sistema de Inmersión Temporal tipo RITA</i>	32
Figura 4 <i>Sistema de Inmersión Temporal tipo BIT</i>	33
Figura 5 <i>Biorreactor Modular de Inmersión Temporal BioMINT</i>	34
Figura 6 <i>Ubicación del Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Flores del Valle S.A</i>	36
Figura 7 <i>Explantes de Eryngium "Blue"</i>	38
Figura 8 <i>Establecimiento de Eryngium "Blue"</i>	39
Figura 9 <i>Plántula regenerada de Eryngium "Blue"</i>	40
Figura 10 <i>Adecuación de la unidad experimental en el Sistema de Inmersión Temporal</i>	41
Figura 11 <i>Análisis de varianza respecto a la relación de los tratamientos y la tasa de multiplicación</i>	45
Figura 12 <i>Prueba de Duncan para la tasa de multiplicación respecto a los tratamientos de la variación de los parámetros del SIT empleados en brotes de Eryngium "Blue"</i>	46
Figura 13 <i>Prueba de Duncan para la tasa de multiplicación respecto a los tratamientos de la variación de los parámetros del SIT empleados en brotes de Eryngium "Blue"</i>	47
Figura 14 <i>Diagrama de barras de las masas iniciales y masas finales de los brotes al concluir un ciclo de propagación en el SIT</i>	48

Figura 15 <i>Brotos de Eryngium “Blue” oxidados en el SIT</i>	51
Figura 16 <i>Brotos de Eryngium “Blue” oxidados en el SIT en el tratamiento F6T2</i>	51
Figura 17 <i>Evaluación de la calidad de los brotes de Eryngium “Blue” respecto a clorosis</i>	52
Figura 18 <i>Prueba T para muestras independientes sobre la influencia del método de propagación sobre la tasa de multiplicación de Eryngium “Blue”</i>	53
Figura 19 <i>Diagrama de barras de la tasa de multiplicación del método de propagación convencional y la tasa de multiplicación por propagación en el SIT</i>	54

Resumen

La industria florícola representa el 5to producto de exportación no petrolera en el país, representando las flores de verano el 13% de participación. Las técnicas de cultivo in vitro permiten la propagación masiva de especies vegetales en condiciones controladas y asépticas, siendo la técnica convencional, en el ámbito comercial, la micropropagación por meristemos pre establecidos en medios de cultivo sólido. Esta técnica permite la obtención de plantas genéticamente iguales y libres de patógenos, sin embargo, es un proceso lento y costoso, principalmente por el uso de agentes gelificantes. Los sistemas de inmersión temporal (SIT) permiten la semi automatización del proceso de propagación, y además reduce los costos de producción. En el presente trabajo se estandarizó las variables de inmersión: tiempo y frecuencia para la especie vegetal *Eryngium "Blue"* de Flores del Valle S.A. Valleflor, en donde se determinó que las variables operacionales para la propagación de la especie vegetal mencionada fueron: tiempo de inmersión de 6 horas y frecuencia de inmersión de 2 minutos, con una tasa de multiplicación de 5.05 brotes por explantes al terminar un ciclo de propagación en el SIT (28 días), siendo superior a la tasa de multiplicación obtenida por el método de propagación convencional de 2.0 brotes por explante. Adicionalmente, se determinó que la calidad respecto a la oxidación y estado clorótico disminuye con tiempos de inmersión cortos, y con un cambio periódico del medio de cultivo de acuerdo al crecimiento del material vegetal en los biorreactores.

Palabras claves: inmersión, biorreactor, explante, meristemos

Abstract

The flower industry represents the 5th non-oil export product in the country, with summer flowers representing 13% participation. In vitro culture techniques allow the massive propagation of plant species under controlled and aseptic conditions, the conventional technique, in the commercial field, being micropropagation by pre-established meristems in solid culture media. This technique allows obtaining genetically identical plants free of pathogens, however, it is a slow and expensive process, mainly due to the use of gelling agents. Temporary immersion systems (SIT) allow the semi-automation of the propagation process, and also reduce production costs. In the present work, the immersion variables were standardized: time and frequency for the plant species *Eryngium* "Blue" from Flores del Valle S.A. Valleflor, where it was determined that the operational variables for the propagation of the aforementioned plant species were: immersion time of 6 hours and immersion frequency of 2 minutes, with a multiplication rate of 5.05 shoots per explants at the end of a propagation cycle. in the SIT (28 days), being higher than the multiplication rate obtained by the conventional propagation method of 2.0 shoots per explant. Additionally, it was determined that the quality with respect to oxidation and chlorotic state decreases with short immersion times, and with a periodic change of the culture medium according to the growth of plant material in the bioreactors.

Key words: immersion, biorreactor, explant, meristem

Capítulo I: Introducción

Antecedentes

La industria florícola en Ecuador representa el 4,5% de exportaciones no petroleras del país, siendo este sector un generador de desarrollo. En el año 2020 la Corporación Financiera Nacional registró alrededor de 237 empresas que se dedican al cultivo de flores (CFN, 2022).

Para cumplir las demandas de exportación de las flores ecuatorianas, las florícolas implementan tecnologías alternativas para incrementar la producción comercial de flores de verano, y satisfacer a los mercados de Estados Unidos, la Unión Europea, Rusia y Canadá, entre otros. Por lo cual, el desarrollo de herramientas biotecnológicas es esencial para la propagación masiva de cultivos de importancia económica.

El cultivo de tejidos *in vitro* comprende un grupo de técnicas mediante las cuales una parte del material vegetal denominado explante se cultiva asépticamente en un medio químico y en condiciones controladas para la propagación de plantas que sean genéticamente iguales y libres de patógenos (Roca & Mroginski, 2006). La técnica convencional del cultivo de tejidos para la propagación masiva de plantas es la micropropagación por meristemas pre establecidos en medios de cultivo sólidos, sin embargo, es un proceso lento y costoso, por lo cual se han desarrollado tecnologías que ayuden a automatizar de manera parcial el proceso de propagación como el sistema de inmersión temporal (SIT) (Castillo et al., 2020).

En el país el sistema de inmersión temporal ha sido desarrollado por la academia para proponer métodos alternativos de propagación en especies frutales como lo menciona Andres et al. (2020) para banano, Goyes & Rojas (2021) para arándano y Flores (2018) para papaya, en especies ornamentales se ha desarrollado investigaciones de Calvache & Freire (2019) para *Nicotiana tabacum* y de Albarracín (2012) para *Eryngium foetidum*, concluyendo todos los autores que la propagación en el SIT brinda mejores resultados en número de brotes, número y

longitud de hojas y tasa de multiplicación, además resaltan la reducción en los costos de producción por planta.

A nivel internacional existen diversas investigaciones donde se compara la propagación por el método convencional frente a la propagación por el SIT, por ejemplo, Navarrete (2018), en su estudio con *Aristolaelia chilensis* obtuvo una tasa de multiplicación de 58 brotes por explante por el SIT, mientras que por el sistema de inmersión convencional tuvo una tasa de multiplicación de 13 brotes por explante, por otro lado, Duban (2018) en su estudio con *Cattleya Schroedera* corrobora que el SIT es viable para la propagación vegetal debido a que se obtienen explantes sin características o cambios fisiológicos como oxidación o hiperhidricidad durante su desarrollo fisiológico, además de presentar resultados significativos en la tasa de multiplicación, y finalmente Alamilla et al. (2019), en su estudio con *Anthurium andreanum* realizó un escalamiento del sistema de inmersión temporal tipo RITA para aumentar la tasa de multiplicación y disminuir los costos de producción, obteniendo una tasa de multiplicación promedio de 24,2 brotes por explante, siendo 6,3 veces mayor la tasa de multiplicación que la del método convencional.

Justificación del problema

El cultivo de tejidos vegetales *in vitro* abarca las técnicas biotecnológicas con mayor desarrollo industrial en los últimos años debido que, gracias a estas tecnologías se puede realizar la micropropagación *in vitro* de plantas a partir de un explante y lograr cultivos que altos estándares en calidad genética y fitosanitaria.

El principal método de propagación *in vitro* es la micropropagación por meristemos pre establecidos en medios de cultivo sólidos o semisólidos, sin embargo, se debe tener en cuenta las limitaciones de esta técnica, entre las cuales destacan los elevados costos de producción en mano de obra y agentes gelificantes, el extenso tiempo de propagación que abarca las

etapas de introducción, multiplicación y enraizamiento, y las altas pérdidas de material vegetal durante la aclimatación en invernaderos, por lo cual desde el punto de vista comercial la utilización de la propagación por el método convencional está limitada a cultivos que tengan un alto valor económico por unidad de planta propagada (A. Castillo et al., 2019).

El desarrollo de tecnologías como el Sistema de Inmersión Temporal permite la semi automatización del proceso de propagación, reduciendo los costos de producción por planta entre un 50 y 60% al disminuir la mano de obra y agentes gelificantes, aumenta de manera significativa la tasa de propagación en tiempos de producción más cortos, sin requerir una amplia área de trabajo (Muñoz, 2019).

En Ecuador no existe una entidad pública o privada que comercialice el Sistema de Inmersión Temporal ocasionando un retraso en el desarrollo tecnológico e investigativo en el área de biotecnología vegetal, por lo cual la presente investigación pretende demostrar la eficiencia del uso del SIT en la propagación *in vitro* usando un prototipo del sistema.

Planteamiento del problema

El aumento de la demanda de flores ecuatorianas entre noviembre de 2020 y noviembre de 2021 se mantuvo en ascenso de acuerdo al reporte de Expoflores publicado en enero del 2022, alcanzado un incremento en el 45%, que representa el 4.5% de exportaciones no petroleras del país (Expoflores, 2021). Dentro de las variedades vegetales, las que más demanda presentan en el mercado son las rosas y las flores de verano.

De acuerdo a la alta demanda de flores de exportación es necesario buscar alternativas de propagación que reduzcan los costos de producción y aumentan la tasa de multiplicación sin alterar la calidad de los cultivos vegetales.

Según la problemática planteada, surge la interrogante: ¿El sistema de inmersión temporal es ventajoso para aumentar la tasa de multiplicación *in vitro* de *Eryngium "Blue"* frente al método de propagación convencional?

Objetivos

Objetivo General

Estandarizar un protocolo de propagación *in vitro* para *Eryngium "Blue"* empleando un sistema de inmersión temporal tipo BIT en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos de Flores del Valle S.A. Valleflor.

Objetivos Específicos

- Establecer las condiciones operacionales: tiempo y frecuencia de inmersión en el sistema de inmersión temporal.
- Determinar la tasa de multiplicación más alta para *Eryngium "Blue"* en el sistema de inmersión temporal.
- Comparar la tasa de multiplicación experimental obtenida en el sistema de inmersión temporal frente a la tasa de multiplicación lograda mediante el método convencional que normalmente realiza el Laboratorio de Cultivo de Tejidos de Flores del Valle S.A. Valleflor.

Hipótesis

H0: El sistema de inmersión temporal tipo BIT no es viable para incrementar la tasa de multiplicación de *Eryngium "Blue"* en comparación con el método de propagación convencional.

H1: El sistema de inmersión temporal tipo BIT es viable para incrementar la tasa de multiplicación de *Eryngium "Blue"* en comparación con el método de propagación convencional.

Capítulo II: Marco teórico

Descripción de la especie

Descripción Botánica

Eryngium L. es un género que comprende a hierbas perennes o bianuales, postradas o erectas de hasta tres metros de altura, caulescentes o acaulescentes (Wang et al., 2012). Sus raíces son fuertes o se presentan en forma de raicillas fibrosas, sus hojas son simples, lobadas o espinoso-dentadas con venación variables, por otro lado, las flores se encuentran dispuestas en cabezuelas bracteadas, cubierto por escamas o tubérculos que protegen el cáliz (García-Ruiz, 2013).

El género *Eryngium* L. se distingue de otros miembros de Apiaceae por las inflorescencias capitulares y por tener una sola bráctea por flor, las cuales varían de color desde tonos blancos, azules o púrpuras. Sus flores son bisexuales, sésiles o a veces pediceladas, con pétalos ovados a oblongos, con ápice reflexivo, y sus frutos en forma de esquizocarpos, globosos y aplanados lateralmente cubiertos por tubérculos o escamas (García-Ruiz, 2013; Goldenberg et al., 2021).

Taxonomía

Eryngium L. es un género perteneciente a la familia Umbelliferae Juss, o mejor conocida como Apiaceae Lindley, se encuentran distribuidas en las regiones montañosas subtropicales y templadas, siendo raras en los trópicos (Wang et al., 2012).

La familia contiene alrededor de 435 géneros y 3780 especies, las cuales se encuentran agrupadas en cuatro subfamilias: Apioideae, Saniculoideae Drude, Mackinlayoideae Plunkett y Lowry, siendo Saniculoideae la subfamilia con mayor diversidad al contener las tres cuartas

partes de la biodiversidad de la familia, y *Eryngium* L. el género más grande y complejo taxonómicamente de la familia Apiaceae (Goldenberg et al., 2021).

A continuación, se presenta el cuadro taxonómico del género *Eryngium* L.

Tabla 1

Clasificación taxonómica del género Eryngium L.

Taxonomía	
Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Apiales
Familia	Apiaceae
Subfamilia	Saniculoideae
Género	<i>Eryngium</i>

La complejidad taxonómica del género radica en la variación morfológica intraespecífica y la existencia de muchos caracteres superpuestos entre las especies (Calviño et al., 2008). Actualmente en América del Sur se han publicado varios artículos sobre *Eryngium*, la mayoría de ellos describiendo las nuevas especies (Goldenberg et al., 2021).

Distribución Geográfica

El género *Eryngium* L. se distribuye desigualmente dentro de los hemisferios oriental y occidental, específicamente la diversidad de la especie se localiza en el oeste de la región del Mediterráneo y el suroeste de Asia, y en la zona centro-oeste de México y centro-oriente de Sudamérica (García-Ruiz, 2013).

En el continente americano hay aproximadamente 100 especies distribuidas desigualmente, reconociendo centros de diversidad en México, Brasil, Argentina y Uruguay (Goldenberg et al., 2021).

Uso y propiedades

La mayoría de las especies de *Eryngium* se cultivan como cultivos ornamentales, vegetales, etnomedicinales y, con el aumento de las investigaciones químicas y biológicas se ha demostrado su potencial como cultivo farmacéutico.

Los estudios *in vitro* han demostrado que los compuestos de aceites no esenciales como terpenoides, saponinas triterpenoides, flavonoides, cumarias, poliacetilenos y esteroides presentan actividades citotóxicas contra líneas celulares tumorales, antiinflamatorias, venenos contra serpientes y escorpiones, efectos antibacterianos, antifúngicos, antipalúdicos, antioxidantes y antihiper glucémicos (Wang et al., 2012).

En países sudamericanos como Perú, Colombia y Ecuador, la planta de *Eryngium* se usa para tratar enfermedades y dolencias relacionadas con el tracto digestivo y ginecológico, como flatulencia, diarrea, indigestión, dolor de estómago y aliviar calambres menstruales (Rodrigues et al., 2022).

Dentro del género *Eryngium*, la especie *E. alpinum* es ampliamente utilizada como flor cortada, tanto fresca como seca en Estados Unidos, siendo nombrada como una de las 30 mejores flores para secado, por otro lado, las plántulas de *E. eburneum* y *E. giganteum* son cultivadas con la finalidad de ser flor de corte y *E. yuccifolium* como *E. ebracteatum* son recomendadas para uso en jardines (Regina et al., 2008).

Establecimiento in vitro

La propagación del género *Eryngium* es limitada siendo *Eryngium alpinum* L. la especie más propagada dentro del género. Kokowaska et al., (2020) logró la micropropagación de esta especie a través del uso de explantes de plantas madres y reguladores de crecimiento que dieron como resultado la producción de plantas clonales, además desarrollaron un método eficiente para la producción de semillas sintéticas mediante la encapsulación de yemas axilares, convirtiéndose en el primer informe sobre la micropropagación y producción de semillas somáticas de esta especie.

Otra de la especie dentro del género *Eryngium* con mayores proyectos de investigación es *E. foetidum* L. de la cual se han establecido protocolos de micropropagación basados en organogénesis de explantes de raíz, hoja, disco de tallo y escapo, dando como resultado 37,2 brotes por explante y tras la transferencia a campo, el 90% de plántulas sobrevivieron y exhibieron caracteres morfológicamente idénticos a la planta madre (Martin, 2008).

Cabe recalcar que los estudios sobre la micropropagación en sistemas de inmersión sobre el género *Eryngium* son escasos, sin embargo, existe información del uso de esta tecnología en otros géneros de importancia.

Cultivo de tejido vegetales

Generalidades

La micropropagación es una técnica de biotecnología vegetal que logra la propagación asexual vegetativa en condiciones controladas y en medios de cultivos artificiales para la producción clonal masiva de plantas (Suárez, 2020).

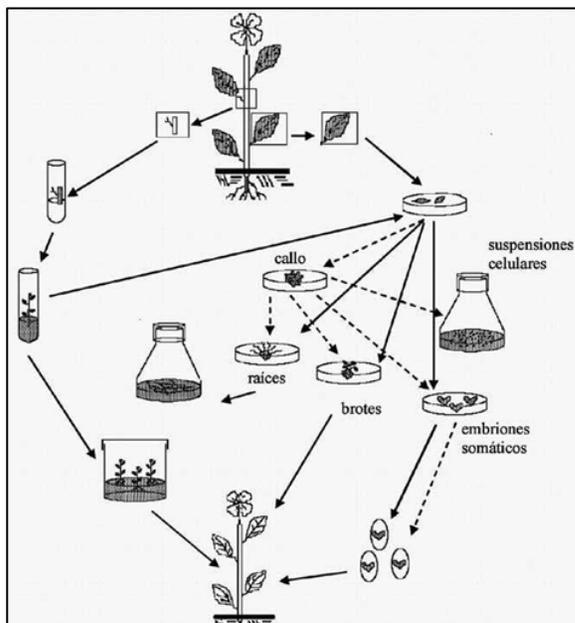
La micropropagación clonal implica la obtención de plántulas que pueden crecer fenotípica y genotípicamente idénticas a la planta original de la que se deriva, o mejor conocida como planta madre (Roca & Mroginski, 2006; Rojas et al., 2006), siendo una herramienta con potencial de producir plantas de calidad uniforme a escala comercial (Suárez, 2020). Esto es viable gracias a la totipotencia que tienen las células vegetales, que es la capacidad de regenerar una planta completa cuando están sometidas a los estímulos adecuados (Olmos et al., 2019).

Existen varios métodos de micropropagación de plantas para realizar la multiplicación clonal, entre las cuales según Roca & Mroginski (2006) tenemos:

- Micropropagación a través de explantes con meristemos pre-establecidos.
- Organogénesis directa
- Organogénesis indirecta
- Embriogénesis somática
- Microinjertos
- Cultivo de embriones

Figura 1

Esquema de los métodos de propagación *in vitro* de diferentes explantes



Nota: Las líneas continuas expresan microporpagación de explantes con meristemos pre existentes, organogénesis o embriogénesis directa, mientras que las líneas quebradas indican la morfogénesis indirecta. Tomado de *Bioteconología y Mejoramiento Vegetal* (p. 29), por Echenique, V., Rubinstein, C., Hopp, E., Mroginski, L., & Levitus, G., 2019, INTA.

El método de propagación convencional utilizado con mayor frecuencia en la multiplicación *in vitro* con fines comerciales es la microporpagación a través de explantes con meristemos pre existentes, en la presente investigación únicamente se abordará a profundidad este método de propagación.

Microporpagación a través de explantes con meristemos pre existentes

En la década de los años 60 la microporpagación *in vitro* recibió un impacto positivo, gracias al descubrimiento de la capacidad que tienen los meristemos y puntas de brotes de

producir protuberancias semejantes a protocormos normales capaces de desarrollarse en plántulas (Roca & Mroginski, 2006).

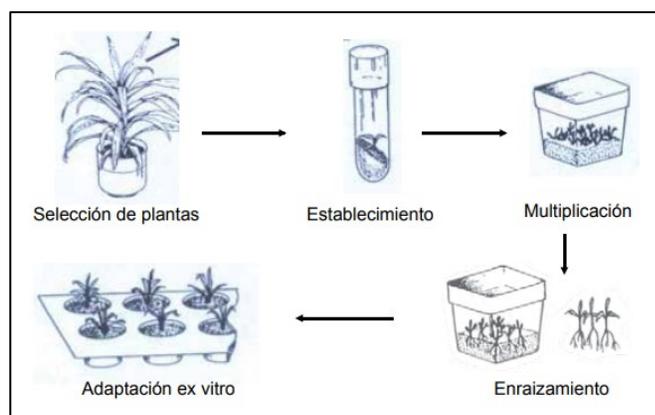
Gracias a este descubrimiento la propagación a través de meristemas o puntas de brotes pre existentes se ha aplicado a cultivos de herbáceas, leñosas y ornamentales para mantener la estabilidad genética y la consistencia en la tasa de multiplicación (Albarracín, 2012; Suárez, 2020).

La micropropagación por meristemas pre existentes, se basa en la inducción repetitiva del crecimiento de yemas axilares presentes en el explante, eliminando así la dominancia apical por la presencia de altas concentraciones de citocininas en el medio de cultivo.

Las etapas esenciales para la propagación por medio de esta técnica se describen en la figura 2.

Figura 2

Esquema de micropropagación a través de explantes pre-existentes



Nota: El gráfico representa los pasos de la micropropagación a través de meristemas pre establecidos. Tomado de *Cultivo de Tejidos Vegetales* (p. 61), por Suárez, I., 2020, Fondo Editorial Universidad de Córdoba.

Estado 0: Selección y acondicionamiento de las plantas madres. Las plantas madres o donadoras de explantes se eligen en base a una selección masal positiva para obtener las características agronómicas deseables (Olmos et al., 2019). Los principales factores fisiológicos que influyen directamente sobre la calidad del explante según Echenique et al. (2019), Roca & Mroginski (2006) y Suárez (2020) son:

- Edad: se obtendrán mejores respuestas *in vitro* mientras más joven e indiferenciado esté el tejido del explante. Los meristemos apicales y axilares se emplean en una amplia gama de especies.
- Estado sanitario general de la planta: los explantes que presentan bajos niveles de patógenos no presentarán problemas graves de contaminación durante su establecimiento.
- Posición de yemas: en el caso de las rosas se ha demostrado que las yemas obtenidas en la mitad del tallo se desarrollan más rápido.

Estado I: Establecimiento del explante. Una vez seleccionados los explantes es necesario realizar una desinfección superficial del material vegetal para evitar la proliferación de microorganismos en el medio de cultivo.

Las principales soluciones empleadas en el cultivo de tejidos son hipoclorito de sodio y de calcio, peróxido de hidrógeno, nitrato de plata y alcohol a diferentes porcentajes (Roca & Mroginski, 2006). La elección y concentración de desinfectantes depende del tipo de cultivo y explante, sin embargo, el procedimiento más habitual es la doble desinfección que consiste en lavados con alcohol al 70% durante 20-60 segundos, seguido una inmersión de 3 a 30 minutos en hipoclorito de sodio al 1-3% (Echenique et al., 2019).

Si es indispensable trabajar con explantes provenientes de plantas muy enfermas es recomendable utilizar técnicas especializadas para la eliminación de patógenos como la

termoterapia, quimioterapia a través de la aplicación de antibióticos, antivirales y desinfectantes, y el cultivo de meristemos (Olmos et al., 2019).

Suárez (2020) determina que durante el establecimiento la planta experimenta una serie de fases:

- Aislamiento, la cual se caracteriza por una alta emisión de fenoles ocasionado por el estrés que sufre el explante.
- Estabilización, presenta un crecimiento inestable e imprevisible de los nuevos brotes.
- Producción, corresponde a la respuesta fisiológica de la planta a las nuevas condiciones.

Estado II: Multiplicación. La fase de multiplicación tiene como objetivo aumentar la cantidad de brotes en los ciclos de multiplicación sucesivos, denominados subcultivos (Rojas et al., 2006). Durante este estado, la composición del medio de cultivo es crítico, puesto que los reguladores de crecimiento: auxinas y citoquininas, determinaran la tasa de multiplicación y mejoraran las características del tallo, sin embargo, el uso de citoquininas y auxinas debe ser realizado con criterio para evitar la formación de callos y evitar la regeneración de tallos adventicios que puede aumentar la variabilidad genética (Suárez, 2020).

Los tipos de auxinas más empleadas son el ácido indol 3 butírico (IBA), ácido 2,4 diclofenoxiacético (2,4-D), ácido indol 3 acético (AIA), ácido naftalanacético (ANA) y picloram, entre las citoquininas tenemos 6- bencilaminopurina (BA), zeatina y tidiazurón.

Unos de los problemas más frecuentes durante la multiplicación es la presencia de compuestos fenólicos oxidados asociados a los tejidos vegetales sometidos a estrés, que pueden inhibir el crecimiento vegetal e incluso matar al explante, para minimizar el daño de

estos compuestos al medio de cultivo se le añade carbón activado, polivinilpirrolidona y ácido ascórbico (Olmos et al., 2019).

A medida que la multiplicación comienza, el explante es subdividido y cada nuevo propágulo es cultivado en un medio fresco de la misma formulación, este procedimiento se realiza de 5 a 7 veces (Suárez, 2020). El número de subdivisiones depende de la especie, pero es necesario no exagerar el proceso porque puede generar cambios genéticos por la acción de las hormonas (Rojas et al., 2006).

Estado III: Enraizamiento. Los brotes formados son transferidos en un medio con alto contenido de auxinas para estimular la rizogénesis (Rojas et al., 2006). El tipo de auxina a utilizar depende de la especie de la planta, el porcentaje de enraizamiento que alcance, el tamaño y grosor de las raíces, y sobre todo el efecto secundario de la auxina sobre la planta en condiciones *ex vitro* (Suárez, 2020).

Este estado es el más costoso durante la propagación debido a los costos de las fitohormonas, mano de obra y tiempo de cultivo (Quintero et al., 2003).

Estado IV: Endurecimiento. Durante el desarrollo en condiciones *in vitro* las plantas son ineficientes en la síntesis de carbohidratos dando como resultado un pobre desarrollo de cloroplastos y una baja capacidad para fijar el CO₂, además gracias a los altos porcentajes de humedad en las condiciones *in vitro*, las hojas no desarrollan una cutícula cerosa e impermeable con estomas funcionales (Suárez, 2020), que provocan un alta tasa de transpiración que puede ocasionar la muerte de las plántulas por deshidratación (Echenique et al., 2019). Debido a estas condiciones las plantas deben ser sometidas a un endurecimiento, el cual consiste en someter las plántulas a un ambiente cercano al 95% de humedad relativa y 40% de exposición solar durante los primeros 7 días, a medida que la plántula se adapta su

nuevo ambiente la humedad relativa disminuye y la exposición solar aumenta paulatinamente para asegurar su supervivencia en condiciones *ex vitro* (Rojas et al., 2006)

Sistema de Inmersión Temporal

Generalidades

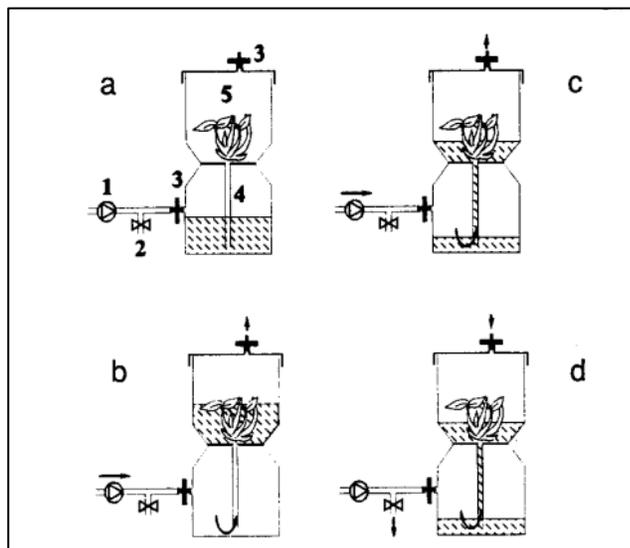
Una de las tecnologías que automatizan el proceso de micropropagación son los sistemas de inmersión temporal que consiste en la inmersión periódica de los explantes en el medio de cultivo, permitiendo el intercambio gaseoso dentro del recipiente, que se denomina biorreactor (A. Castillo et al., 2019). Este tipo de sistema emplea medios de cultivo líquidos que mejoran la difusión de nutrientes y la difusión de agua (Fuentes et al., 2019).

Sistema de Inmersión tipo RITA

El sistema de inmersión temporal automatizada (RITA) fue desarrollado por Alvard et al. (1993). El sistema está compuesto por un único envase con dos compartimentos, el superior contiene los explantes y el inferior contiene el medio líquido, cuando se aplica una sobrepresión en el compartimento inferior el medio de cultivo es empujado al compartimento superior, y cuando la sobrepresión cae, el medio regresa a su compartimento inicial (Fuentes et al., 2019). Las plantas permanecen sumergidas tanto tiempo como la presión es aplicada, y durante este tiempo el aire es impulsado continuamente al compartimento superior provocando la agitación de los tejidos y la renovación de la atmósfera dentro del frasco (L. Castillo et al., 2020).

Figura 3

Sistema de Inmersión Temporal tipo RITA.



Nota: Tomado de *Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation Effects of temporary immersion of explants* (p. 57), por Alvard et al., 1993, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*.

Los sistemas de inmersión temporal tipo RITA son utilizados con éxito en la micropropagación de frutales y especies ornamentales incrementando en un rango de 20 a 70% la tasa de multiplicación (Fuentes et al., 2019).

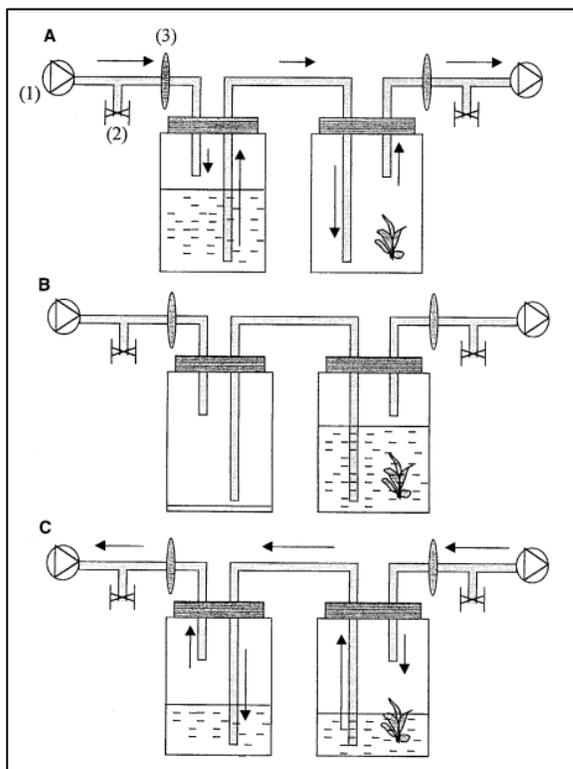
Sistema de Inmersión Temporal tipo BIT

El sistema de frascos gemelos (BIT) fue patentada por Escalona et al., (1999). Están integrados por dos contenedores denominados biorreactores, uno contiene el material vegetal de interés y otro el medio del cultivo líquido. Los biorreactores están conectados entre sí por una manguera de silicona que se inserta en la tapa de cada recipiente y desciende hasta el fondo para permitir el intercambio de cultivo (L. Castillo et al., 2020). La presión del aire por el

compresor provoca el transporte del medio por tiempos intermitentes al biorreactor que contiene el cultivo vegetal (Fuentes et al., 2019).

Figura 4

Sistema de Inmersión Temporal tipo BIT

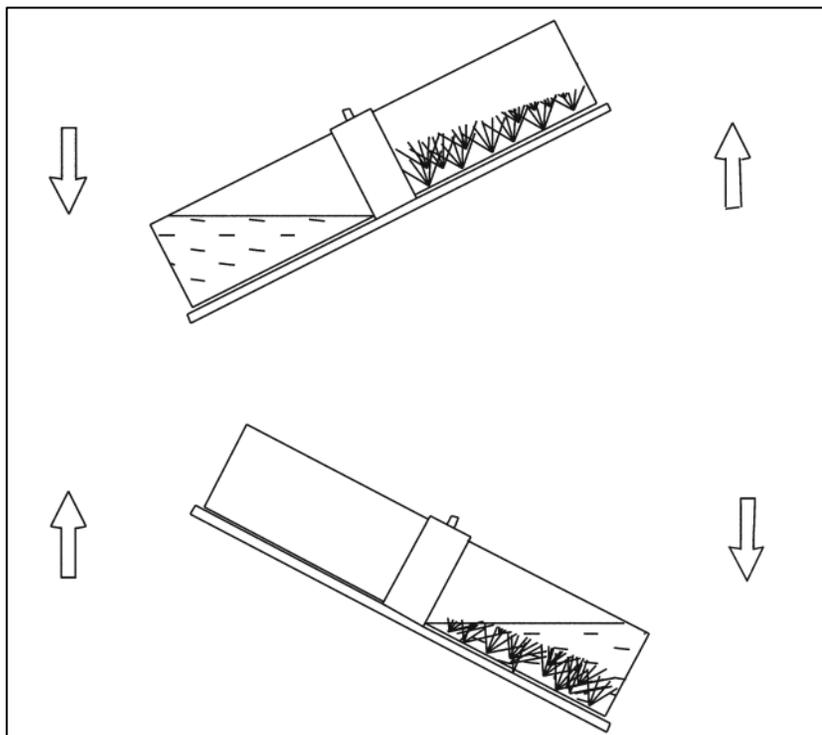


Nota: Tomado de *Pineapple (Ananas comosus L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems*, (p. 744), por Escalona et al., 1999, *Plant Cell Reports*.

Biorreactor Modular de Inmersión Temporal (BioMINT)

BioMINT es un sistema de inmersión desarrollado por Robert et al. (2006), y consiste en dos vasos cilíndricos conectados por un adaptador acoplado a una plataforma que cambia de inclinación gracias al panel de control programable (Figura 5).

Figura 5 *Biorreactor Modular de Inmersión Temporal BioMINT*



Nota: Tomado de *Temporary Immersion Bioreactor System A New Temporary Immersion Bioreactor System for Micropropagation*, (p. 126), por Robert et al., 2006, *Methods in Molecular Biology*.

Ventajas del Sistema de Inmersión Temporal

Las principales ventajas de este sistema es el aumento de la tasa de multiplicación, el rápido crecimiento de las plantas, reducciones en los costos del medio de cultivo al eliminar el agar como agente solidificante, disminución de la mano de obra, menor necesidad de espacio porque dentro de los biorreactores se colocan más planta por unidad de superficie de crecimiento y tener un mayor control sobre la sanidad del material propagado (L. Castillo et al., 2020). Por otro lado, Castillo, Moreno & García (2020) afirman que la utilización de este tipo de tecnologías favorece la aclimatación y endurecimiento de las plantas en invernadero, se evita

las impurezas del agente gelificante, además que se presenta un mayor crecimiento del explante debido a que presenta mayor superficie de contacto con el medio líquido favoreciendo su absorción.

Capítulo III: Metodología

Ubicación del lugar de investigación

Ubicación política

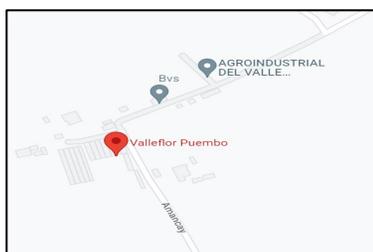
El laboratorio de Investigación y Desarrollo de Flores del Valle S.A. Valleflor, se ubica en la provincia de Pichincha al nororiente del Distrito Metropolitano de Quito, Parroquia Puembo, vía antigua Amancay, Puembo 170179.

Ubicación geográfica

El Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Flores del Valle S.A. Valleflor se encuentra a una altitud de 2300 m.s.n.m en las coordenadas latitud $0^{\circ}12'38.87''$ S y longitud $78^{\circ}21'22-17''$ O. Limita al norte con las parroquias rurales de Tumbaco y Pifo, al este con la parroquia de Tababela y al oeste con las parroquias de Tumbaco y Pifo.

Figura 6

Ubicación del Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Flores del Valle S.A.



Nota: Tomado de Google maps, 2022.

Ubicación Ambiental

De acuerdo a los datos reportados por el Plan de Desarrollo y Ordenamiento Territorial 2019 -2023, se extraen los siguientes datos.

- Altitud: 2300 m.s.n.m
- Clima: cálido seco
- Temperatura: 16.5 – 18.5 °C
- Relieve: 2100 a 2500 m.s.n.m.
- Suelo: tierras arables en 67.42%
- Precipitación: promedio anual de 71.9 mm.
- Recursos hídricos: río Guayllabamba, Chiche y Guambi.

Material Experimental

Los equipos utilizados fueron: cámara de flujo laminar, balanza analítica y autoclave vertical.

Los insumos de laboratorio fueron: mangos de bisturís 3 y 4, hojas de bisturí 12 y 22, pinzas quirúrgicas, vasos de precipitación de 1000 mL, boecos de 1000 mL, frascos de vidrio con tapa rosca y tubos de ensayo.

Los reactivos utilizados fueron: sales MS_4O_4 , 6-bencilaminopurina y PPM.

Métodos

Recolección del material vegetal

Las plantas donadoras de explantes tienen 1 año 7 meses de edad y fueron despuntadas previamente para desactivar la dominancia apical y permitir el crecimiento de tallos laterales, los cuales fueron los explantes recolectados. Otro de los parámetros evaluados durante selección del material vegetal fueron las características fisiológicas como: plantas en crecimiento activo, vigorosas, libres de enfermedades especialmente de fúngicas y, aquellas que presentaron mayor cantidad de tallos laterales.

La recolección del material vegetal se realizó con tijeras de poda, las cuales fueron desinfectadas para evitar contaminación. El material vegetal que se recolectó fueron tallos en formación localizadas en la base de la planta, para obtener explantes con callosidades. Además, se controló la homogeneidad del tamaño de los explantes durante su recolección.

El material vegetal se transportó en una funda plástica humedecida con agua al laboratorio de Investigación y Desarrollo de Flores del Valle S.A. ValleFlor para su procesamiento.

Figura 7

Explantes de Eryngium "Blue"



Establecimiento de Eryngium "Blue"

Para el establecimiento de los explantes de *Eryngium "Blue"* en el laboratorio de cultivo de tejidos se utilizó el protocolo establecido por el Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Flores del Valle S.A. Valleflor con modificaciones.

Los explantes previamente seleccionados se sometieron a una desinfección en dos pasos, los cuales se denominan: desinfección fuera de cámara de flujo laminar y desinfección en cámara de flujo laminar.

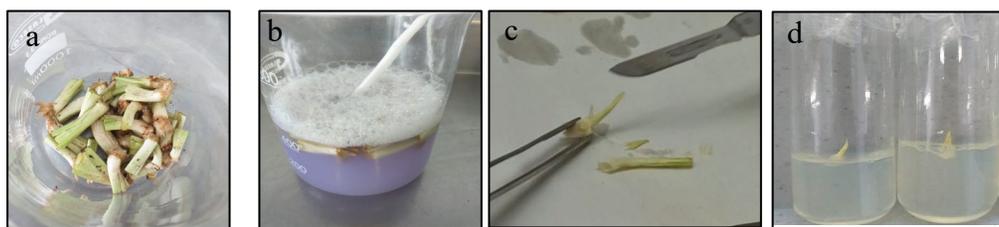
La desinfección fuera de cámara de flujo laminar consistió en la limpieza superficial del explante. Primero se realizó el lavado del material vegetal con una solución de detergente para eliminar restos de tierra y posteriormente lavados con soluciones de pesticidas para eliminar microorganismos patógenos, los pesticidas utilizados fueron el fungicida SWITCH y el fungicida-bactericida PHYTON.

La desinfección dentro de cámara de flujo de laminar consistió en lavados con soluciones de compuestos químicos; etanol 70% e hipoclorito de sodio (NaOCl) al 2% como germicidas y agentes antioxidantes.

Con los explantes asépticos se realizó el procesamiento del material vegetal, el cual consistió en retirar cuidadosamente las hojas maltratadas por la desinfección hasta obtener el meristemo apical del tallo cubierto por los primordios foliares, una vez finalizado el procesamiento el material vegetal se sembró en un tubo de ensayo que contenía un medio de cultivo sólido básico establecido previamente por el laboratorio.

Figura 8

Establecimiento de Eryngium "Blue"



Nota: a. Explantes de *Eryngium "Blue"* sin procesar b. Desinfección fuera de cámara de flujo laminar con solución detergente c. Procesamiento vegetal hasta obtener el meristemo protegido por primordios foliares d. Siembra del material vegetal en el medio de cultivo básico.

Los explantes se almacenaron en un cuarto de cultivo caliente durante un ciclo de cuatro semanas para su establecimiento, después las plántulas regeneradas se cultivaron en un medio de cultivo que contenía citoquinina 6-bencilaminopurina que favoreció su propagación.

Figura 9

Plántula regenerada de Eryngium "Blue"



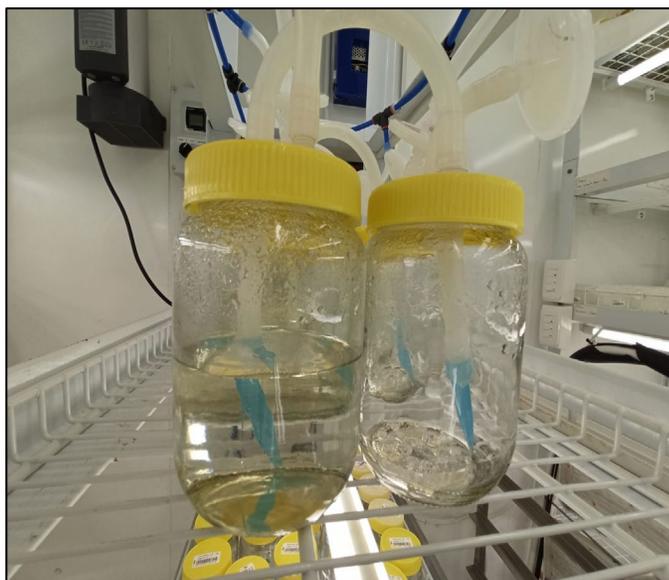
Acondicionamiento del Sistema de Inmersión Temporal

El sistema de inmersión temporal tipo SIT está compuesto por el sistema de control de inmersión, compresor, biorreactores y filtros de aire. Para su acondicionamiento de acuerdo a las necesidades del trabajo de investigación presente se instalaron dos biorreactores de vidrio con tapa rosca de plástico de 500 mL de capacidad volumétrica, uno fue para el crecimiento de brotes y el otro como contenedor del medio de cultivo. Estos frascos estaban conectados entre sí con una manguera de silicona de 1 cm de diámetro, y en su parte interna se colocó la misma manguera de silicona con una punta de micropipeta que descendió hacia el fondo de los

recipientes. El medio de cultivo se desplazó de un biorreactor a otro gracias a la apertura de las electroválvulas que dependían de un temporizador programable que determinó el tiempo y frecuencia de inmersión, el movimiento del medio de cultivo se realizó por la presión de aire de 2,0 atm ejercida por el compresor. La esterilidad del aire se logró por la utilización de filtros de aire hidrofóbicos TISCH Scientific de 0,22 μm .

Figura 10

Adecuación de la unidad experimental en el Sistema de Inmersión Temporal



Desinfección del Sistema de Inmersión Temporal

Los biorreactores y las mangueras de siliconas se lavaron con ácido hipocloroso BiosolNeu para asegurar la eliminación de microorganismos patógenos. Los biorreactores, las mangueras de silicona y los filtros del aire se autoclavaron por un periodo de 15 minutos a 121 °C.

Prueba de contaminación

El sistema de inmersión temporal estuvo en funcionamiento durante 14 días únicamente con el medio de multiplicación para *Eryngium* estandarizado por el Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Flores del Valle S.A. Valleflor para determinar la presencia o ausencia de microorganismos.

Tratamientos

Se establecieron cuatro (4) tratamientos con dos variables independientes: tiempo y frecuencia de inmersión.

Tabla 2

Tiempos y Frecuencias de Inmersión evaluados en el sistema de Inmersión Temporal

Variables	Frecuencia de Inmersión (horas)	Tiempo de inmersión (minutos)
F4T2	4	2
F5T2	5	2
F6T1	6	1
F6T3	6	3

Tipo de Diseño Experimental

Se aplicó un diseño completamente al azar en un tratamiento bifactorial (2x3x3) con 4 repeticiones, siendo la frecuencia y el tiempo de inmersión los factores analizados.

Se instalaron 4 unidades experimentales, las cuales fueron los biorreactores de vidrio con tapa de rosca plástica de 500 mL de capacidad volumétrica. En cada unidad experimental se dispuso de cinco (5) explantes de *Eryngium "Blue"* establecidos con anterioridad, teniendo un total veinte (20) explantes.

A los 28 días de cultivo se seleccionó al azar el orden de las unidades experimentales y se evaluaron las variables de respuestas. Los datos se procesaron estadísticamente mediante un análisis de varianza de clasificación simple (completamente al azar), si existió homogeneidad de varianza la comparación múltiple se realizó con la prueba de Tukey caso contrario se aplicó la prueba de Duncan con un nivel de significación de $p < 0,05$.

Variables a medir

- **Tasa de multiplicación:** Este parámetro se midió a los 28 días de cultivo y se utilizó la siguiente fórmula:

$$tasa\ de\ multiplicaci\o{n} = \frac{\# brotes\ finales}{\# brotes\ iniciales}$$

- **Masa:** Este parámetro se midió pesando la unidad experimental inicial y la unidad experimental final luego de los 28 días de cultivo utilizando una balanza analítica.

- **Calidad:** Este parámetro se determinó de acuerdo al criterio del investigador. Se seleccionaron los brotes que cumplen con los siguientes parámetros: contaminados, no contaminados, oxidados, no oxidados, cloróticas y no cloróticas.

Capítulo IV: Resultados

Efecto de los tratamientos en la tasa de multiplicación

La tasa de multiplicación o índice de proliferación corresponde a la razón entre los brotes finales y brotes iniciales, es decir, el número de brotes obtenidos al concluir un ciclo de propagación en el SIT, y el número de brotes en el sistema inicialmente.

Se realizó un ANOVA para analizar la relación entre los diferentes tratamientos experimentales y la tasa de multiplicación obteniéndose un valor p de 0.0114 (Figura 11), lo cual indica que al menos uno de los tratamientos experimentales es diferente con un nivel de significancia del 5%.

Figura 11

Análisis de varianza respecto a la relación de los tratamientos y la tasa de multiplicación

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	39.14	3	13.05	5.73	0.0114
Tratamientos	39.14	3	13.05	5.73	0.0114
Error	27.30	12	2.28		
Total	66.44	15			

En la prueba de comparación múltiple de Duncan se encontraron dos grupos estadísticos, el grupo A abarcó los tratamientos F4T2, F5T2 y F6T3, mientras que el grupo B abarcó el tratamiento F6T3.

Figura 12

Prueba de Duncan para la tasa de multiplicación respecto a los tratamientos de la variación de los parámetros del SIT empleados en brotes de Eryngium "Blue"

Test:Duncan Alfa=0.05

Error: 2.2750 gl: 12

Tratamientos Medias n E.E.

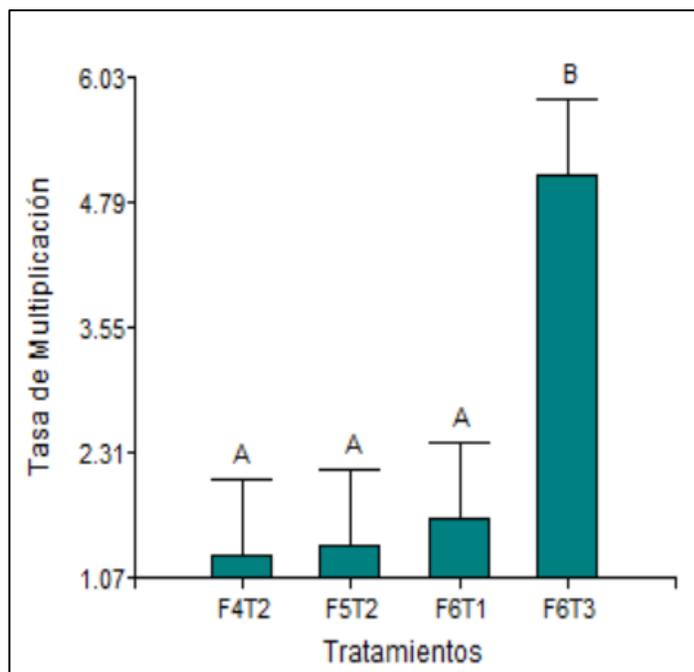
Tratamientos	Medias	n	E.E.	
F4T2	1.30	4	0.75	A
F5T2	1.40	4	0.75	A
F6T1	1.65	4	0.75	A
F6T3	5.05	4	0.75	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Al concluir un ciclo de 28 días en el SIT se determinó y comparó la tasa de multiplicación de cada tratamiento. Para el tratamiento F4T2 que corresponde a una frecuencia de inmersión de 4 horas y un tiempo de inmersión de 2 min se determinó una tasa de multiplicación de 1.3, para el tratamiento F5T2 que corresponde a una frecuencia de inmersión de 5 horas y un tiempo de inmersión de 2 min se determinó una tasa de multiplicación de 1.4, para el tratamiento F6T1 que corresponde a una frecuencia de inmersión de 6 horas y un tiempo de inmersión de 1 min se determinó una tasa de multiplicación de 1.65 y finalmente para el tratamiento F6T3 que corresponde a una frecuencia de inmersión de 6 horas y un tiempo de inmersión de 3 minutos se determinó una tasa de multiplicación de 5.05, concluyendo que el valor máximo de la tasa de multiplicación se obtuvo en con el tratamiento F6T3, y el valor mínimo de la tasa de multiplicación se obtuvo con el tratamiento F4T2.

Figura 13

Prueba de Duncan para la tasa de multiplicación respecto a los tratamientos de la variación de los parámetros del SIT empleados en brotes de Eryngium "Blue"

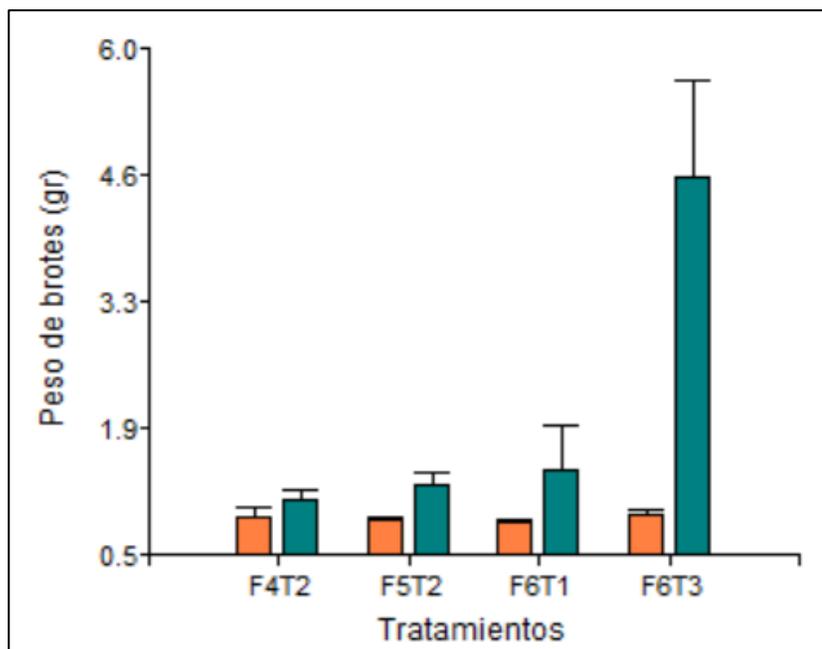


Efecto de los tratamientos en la masa

La masa de los brotes al finalizar un ciclo (28 días) de propagación en el SIT demuestran el crecimiento de los mismos, los cuales varían de acuerdo a los diferentes tratamientos aplicados. El tratamiento que presenta mayor aumento en masa de los brotes es F6T3 (frecuencia de inmersión de 6 horas y tiempo de inmersión de 3 min) con una masa final de 4.608 gr., siendo la mayor masa alcanzado en comparación con los demás tratamientos. Por otro lado, el tratamiento que evidenció la menor masa de los brotes corresponde al tratamiento F4T2 (Frecuencia de inmersión de 4 horas y tiempo de inmersión de 2 min) con una masa final de 1.106 gr.

Figura 14

Diagrama de barras de las masas iniciales y masas finales de los brotes al concluir un ciclo de propagación en el SIT.



Nota: Las barras de color naranja corresponden a las masas iniciales de los brotes, y las barras de color azul corresponden a las masas de brotes al concluir un ciclo de propagación en el SIT.

Efecto de los tratamientos en la calidad de los brotes

Al finalizar el ciclo de propagación en el SIT (28 días) los brotes obtenidos fueron evaluados de acuerdo a los parámetros de calidad establecidos por el criterio del investigador. En primer lugar, se evaluó la presencia o ausencia de microorganismos contaminantes (hongos y/o bacterias), en segundo lugar, se evaluó la cantidad de brotes oxidados y en tercer lugar se evaluó la cantidad de brotes cloróticos. En la tabla 5 se presenta el resumen de la evaluación de los parámetros de calidad.

Tabla 3

Evaluación de los parámetros de calidad de los brotes obtenidos de Eryngium "Blue" al finalizar un ciclo de propagación en el SIT.

Tratamientos	N° brotes	Parámetros de calidad			N° brotes de calidad
		Contaminación	Oxidado	Clorótico	
F4T2	11	-	5	-	6
F4T2	12	-	5	-	7
F4T2	9	-	5	-	4
F4T2	14	-	5	-	9
F5T2	10	-	5	-	5
F5T2	13	-	6	-	7
F5T2	11	-	4	-	7
F5T2	13	-	4	-	9
F6T1	21	-	7	8	14

Tratamientos	N° brotes	Parámetros de calidad			N° brotes de calidad
		Contaminación	Oxidado	Clorótico	
F6T1	5	-	5	5	0
F6T1	18	-	5	7	11
F6T1	17	-	5	8	8
F6T3	31	-	5	-	18
F6T3	28	-	7	-	15
F6T3	35	-	5	-	23
F6T3	50	-	5	-	45

Al concluir el ciclo de propagación en el SIT los brotes obtenidos estuvieron libres de microorganismos contaminantes como hongos y bacterias; mientras que todas las unidades experimentales de los 4 tratamientos se caracterizaron por presentar un promedio alrededor de 5 brotes oxidados en cada unidad de experimental, teniendo en cuenta que en una unidad experimental del tratamiento F6T1 existe necrosis total de explantes. Los brotes se determinaron como oxidados por el oscurecimiento del tejido vegetal y del medio de cultivo (Fig. 15).

Figura 15

Brotos de Eryngium "Blue" oxidados en el SIT



El tratamiento F6T3 presentó oxidación de los explantes iniciales, mas no de los explantes nacientes como se puede visualizar en la figura 16.

Figura 16

Brotos de Eryngium "Blue" oxidados en el SIT en el tratamiento F6T2



El tratamiento F6T1 presentó 5 brotes cloróticos respectivamente. Los brotes se determinaron como cloróticos cuando existe pérdida de clorofila en las hojas de los brotes, evidenciándose como hojas de color amarillento.

Figura 17

Evaluación de la calidad de los brotes de Eryngium "Blue" respecto a clorosis.



Nota: a. Brotes de Eryngium "Bue" cloróticos b. Brotes de Eryngium "Blue" no cloróticos.

Comparación de la tasa de multiplicación por el método convencional y método experimental

El mejor tratamiento para la propagación de *Eryngium "Blue"* en el sistema de inmersión temporal correspondió al tratamiento F6T3 (frecuencia de inmersión de 6 horas y el tiempo de inmersión de 3 min), por lo cual se procedió a la comparación de las tasas de multiplicación del sistema de propagación convencional y el mejor tratamiento para la propagación por el SIT.

La prueba T para muestras independientes tuvo un valor p de 0.1124 lo cual infiere que hay pruebas suficientes para afirmar que la tasa de multiplicación de *Eryngium "Blue"* varía de acuerdo al método de propagación utilizado con nivel de significancia del 5%.

Figura 18

Prueba T para muestras independientes sobre la influencia del método de propagación sobre la tasa de multiplicación de Eryngium "Blue".

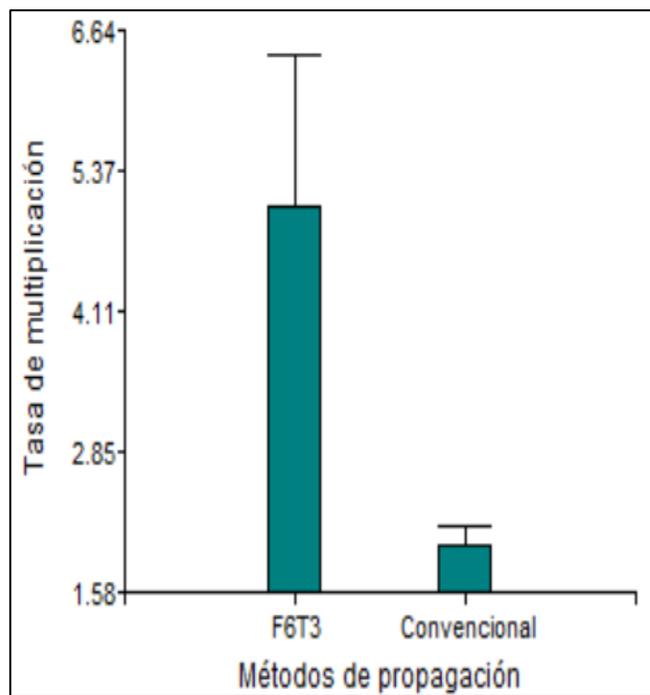
Variable:Tasa de multiplicación - Clasific:Tratamiento - prueba:Bilateral

	Grupo 1	Grupo 2
	Convencional	F6T3
n	6	4
Media	2.00	5.05
Varianza	0.21	7.37
Media (1) -Media (2)	-3.05	
LI (95)	-7.41	
LS (95)	1.31	
pHomVar	0.0018	
T	-2.23	
gl	3	
p-valor	0.1124	

El diagrama de barras (figura 10) demuestra la diferencia entre las tasas de multiplicación obtenidas por el método convencional y por el SIT. El sistema de inmersión temporal con los parámetros de frecuencia de inmersión de 6 horas y tiempo de inmersión de 3 minutos obtuvo una tasa de multiplicación superior al método de propagación convencional, obteniéndose valores de 5.05 y 2.00 respectivamente.

Figura 19

Diagrama de barras de la tasa de multiplicación del método de propagación convencional y la tasa de multiplicación por propagación en el SIT



Capítulo V: Discusión

El cultivo de plantas *in vitro* es una técnica de propagación masiva de plantas que permiten la obtención de especies vegetales en menor tiempo y en un espacio reducido, motivo por el cual esta metodología ha inducido el interés de la micropropagación como actividad comercial (Luis et al., 2019) . La técnica convencional *in vitro* de plantas desde el punto de vista comercial está limitada para cultivos que presenten un alto valor económico por unidad de plantas conseguidas al finalizar el proceso, por lo cual es importante desarrollar otras alternativas tecnológicas que automaticen los procesos mencionados en el capítulo I sobre el cultivo convencional *in vitro* (L. Castillo et al., 2020).

La micropropagación *in vitro* a través de los Sistemas de Inmersión Temporal (SIT) es la técnica más viable para la propagación con fines comerciales, por lo cual, la estandarización del SIT para *Erygium "Blue"* se realizaron 4 tratamientos en los cuales se utilizaron diferentes tiempos de inmersión para las variables. De acuerdo a la prueba de Duncan se obtuvo dos grupos estadísticamente significativos, siendo el tratamiento F6T3 (frecuencia de inmersión de 6 horas y tiempo de inmersión de 3 minutos) el que alcanzó una media superior con respecto a la tasa de multiplicación en comparación con los otros tratamientos. De acuerdo con Sánchez et al. (2005) los tiempos cortos de inmersión favorecen la renovación del ambiente gaseoso dentro de los biorreactores debido a la baja resistencia de la difusión de los gases y a la ruptura mínima del intercambio gaseoso entre los tejidos y la atmósfera. Por otro lado, la constante agitación del flujo de aire favorece la expansión de los tejidos y como consecuencia facilita un mayor contacto entre el medio y el cultivo vegetal evitando su desecación (Fuentes et al., 2019), además el tiempo corto de inmersión evita problemas de hiperhidricidad (A. Castillo et al., 2019). La frecuencia de inmersión depende de la asimilación de nutrientes para cada cultivo y la fase de propagación en la que se encuentre. La investigación realizada determinó que para *Erygium "Blue"* las variables de inmersión con mejores resultados fueron con una

frecuencia de 6 horas y un tiempo de 3 minutos, obteniendo una tasa de multiplicación de 5.05 brotes por explante, siendo superior a los resultados obtenidos por Albarracín (2012) en su investigación realizada con *Eryngium foetidum*, donde la tasa de multiplicación fue 2.2 brotes por explante con una frecuencia de inmersión de 4 horas y un tiempo de inmersión de 2 minutos, sin embargo, dentro de la misma investigación y bajo los mismos parámetros de inmersión se realizó variaciones en la concentración de citoquininas, concluyendo que con 2.5 mgL⁻¹ de BAP la tasa de multiplicación es de 7.13 brotes por explante, cabe mencionar que en este estudio se decidió no modificar la concentración de BAP en el medio de cultivo establecido por el Laboratorio de Cultivos de Tejidos para aumentar la tasa de multiplicación debido a que la disponibilidad agua, sales minerales y citoquininas es diferente en medio líquido, y además con la ausencia de agar aumenta la habilidad de las especies vegetales para absorber ciertos reguladores de crecimiento (Murrell et al., 2002), por lo antes mencionado, el medio de cultivo debe contar con los menores constituyentes posibles para evitar intoxicación de los cultivo.

Debido a la poca información bibliográfica sobre propagación de *Eryngium* en el SIT, los resultados obtenidos se compararon con la propagación de plantas ornamentales que emplearon la misma tecnología, como lo evidenció Mosqueda et al. (2017) en su investigación con *Gerbera jamesonii* donde obtuvo una tasa de multiplicación de 6.7 después de 28 días de cultivo con una frecuencia de inmersión de 8 horas, Alves et al., (2021), en su estudio con *Corema Album* obtuvo el doble de la tasa de multiplicación en comparación con el cultivo el medio sólido usando un sistema de inmersión temporal marca SETIS™, Murrell et al. (2002) en su trabajo con *Bergenia spp. Var Herbtlüte* donde obtuvo una tasa de multiplicación de 3.9 por SIT tipo RITA con frecuencia de inmersión de 8 horas y un tiempo de inmersión de 2 minutos, por otro lado, Capote et al. (2009) en su investigación con *Vriesea* determinó una tasa de multiplicación de 6.1 utilizando un SIT tipo BIT con una frecuencia de inmersión de 5 horas y un tiempo de inmersión de 1 minuto, por el lado de las orquídeas, Tirado et al. (2005) en su

investigación con *Phalaenopsis* determinó que los mejores resultados de propagación por SIT tipo RITA son con una frecuencia de inmersión de 4 horas y un tiempo de inmersión de 1 minuto. De manera industrial el uso de SIT ha proporcionado resultados prometedores para la propagación masiva de plantas ornamentales, tal es el caso de la propagación de *Anthurium andreanum* que con una frecuencia de inmersión de 2 minutos cada 8 horas se obtuvieron en biorreactores TIB® y Ebband-Flow tasas de multiplicación de 50.83 y 43.16 brotes por explante, respectivamente (Ramírez et al., 2019).

Durante un ciclo de propagación en SIT, de 28 días, se evidenció un aumento en masa (gramos) de los explantes, con una ganancia de 3.43 gramos lo cual indica una cuantificación de la biomasa formada y en formación de brotes durante un ciclo de propagación en el SIT, sin embargo, no toda la biomasa formada cumplió con los requisitos de calidad propuesto durante la investigación. El tratamiento (F6T1) presentó mayor cantidad de brotes cloróticos, esto se debe a que los brotes no tuvieron los nutrientes necesarios por el corto tiempo de inmersión, por lo cual fisiológicamente los brotes perdieron clorofila, tornándose las hojas de color amarillo (Espinosa et al., 2011), por otro lado, los tratamientos F4T2 y F5T2 presentaron necrosis en al menos 5 explantes, lo cual puede estar relacionada con el estrés oxidativo provocado por un tiempo prolongado de inmersión que afecta la tasa de respiración, lo que provoca el incremento de la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) y la peroxidación de lípidos induciendo hiperhidricidad y estrés oxidativo, que fisiológicamente se observa como la necrosis del tejido vegetal (Martre et al., 2001). El tratamiento F6T3 tuvo los mejores resultados con respecto a la tasa de multiplicación, sin embargo, se obtuvieron 5 explantes necróticos, estas plantas mencionadas fueron aquellas con las cuales se inició el tratamiento, es decir, se presentó necrosis de las hojas viejas, no de la biomasa formada, esto puede deberse a un desequilibrio nutricional debido que a medida que la biomasa crece en los biorreactores el medio de cultivo no le abastece para alimentar las plantas jóvenes, por lo cual, las hojas viejas

proveen los fotosintatos almacenados en su interior a las hoja más jóvenes ocasionando el color amarillento y posteriormente su necrosis (Mengel & Kirkby, 2000), para Suárez (2020) cuando existe una alta proliferación del cultivo vegetal, como en el caso del SIT, es necesario cambiar el medio de cultivo cada semana para reponer los nutrientes y eliminar los productos de degradación que puedan ocasionar la muerte de explantes.

Al comparar la tasa de multiplicación obtenida por el método convencional y por el SIT, tenemos valores de 2.0 y 5.05 respectivamente, evidenciado la eficiencia del Sistema de Inmersión Temporal para la propagación de *Erygium "Blue"*. Así mismo, si comparamos la tasa de multiplicación del SIT de *Erygium "Blue"* con la tasa de multiplicación por el método convencional de otras especies del género *Erygium* tenemos que para *Eryngium maritimum* la tasa de multiplicación es de 3.6 (Tonato, 2021), y para *Eryngium viviparum* la tasa de multiplicación es de 3.1 (Ayuso, 2020).

El SIT en cultivo de tejidos establece una tecnología accesible que permite automatizar de manera parcial algunas etapas del cultivo *in vitro*, mejorando la eficiencia y productividad del material vegetal para uso comercial (L. Castillo et al., 2020).

Finalmente, las principales ventajas del SIT en comparación con el método tradicional son que evita los problemas de hipoxia e hiperhidricidad presentes en cultivos de medio sólidos (Duban, 2018). La presión del aire que traslada de un biorreactor a otro el medio sumerge completamente a las plantas, aumentando su disponibilidad y captación de absorción (A. Castillo et al., 2019). En cuanto al uso del SIT en laboratorios de cultivo de tejidos con fines comerciales las principales ventajas son que reduciría el costo de mano de obra y de agentes gelificantes, además de asegurar la obtención de grandes cantidades de plantas sanas en un corto periodo de tiempo (A. Castillo et al., 2019; Duban, 2018; Rivero et al., 2016).

Conclusiones

Las condiciones operacionales del sistema de inmersión temporal para la propagación de *Eryngium "Blue"* fueron: frecuencia de inmersión de 6 horas y tiempo de inmersión de 3 minutos.

La tasa de multiplicación obtenida mediante la propagación en el sistema de inmersión temporal de *Eryngium "Blue"* fue de 5.05 brotes por explantes.

La tasa de multiplicación obtenida por la propagación mediante el sistema de inmersión temporal tipo BIT fue aproximadamente el doble en comparación con el método de propagación convencional, 5.05 y 2.0 respectivamente.

Con el desarrollo de la investigación se generó un protocolo de propagación alternativo al método convencional para la propagación *in vitro* de *Eryngium "Blue"* en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos de Flores del Valle S.A. Valleflor.

Recomendaciones

Implementar el sistema de inmersión temporal en las etapas de multiplicación y enraizamiento en la propagación *in vitro* de *Eryngium "Blue"* para aumentar el rendimiento de productividad.

Propagar explantes que provengan de cultivos limpios para evitar la pérdida total del material vegetal a propagar en el SIT, y reducir el tiempo de propagación al evitar problemas de contaminación.

Renovar el medio de cultivo cada 5 días después de iniciar la propagación en el SIT para renovar los nutrientes y eliminar los desechos tóxicos.

Verificar que la hermeticidad de los biorreactores que componen el SIT para evitar fugas que aire que dificulten correcto funcionamiento del sistema.

Envases de plástico para alimentos o envases de vidrio para granos no se recomienda usar como biorreactores.

Incentivar la investigación experimental de la propagación *in vitro* por medio del SIT del género *Eryngium* para generar datos comparativos en futuras investigaciones.

Bibliografía

- Alamilla, J., José, Caamal., Criollo, M., Vera, J., & Reyes, J. (2019). Biofactory and temporary immersion bioreactor: In vitro propagation of *Anthurium andreanum* L., and economic viability. *Agro Productividad*, 12(10), 23–29.
- Albarracín, C. (2012). *Evaluación de la eficiencia de un sistema de inmersión temporal frente al método de propagación convencional en la multiplicación in vitro de cilantro cimarrón (eryngium foetidum) a partir de hojas, yemas y segmentos nodales* [Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE].
<https://doi.org/http://repositorio.espe.edu.ec/xmlui/bitstream/handle/21000/5265/T-ESPE-033268.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Alvard, D., Cote, F., & Teisson, C. (1993). Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation effects of temporary immersion of explants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 32, 55–60.
- Alves, V., Pinto, R., Debiasi, C., Santos, M. C., Gonçalves, J. C., & Domingues, J. (2021). Micropropagation of *Corema album* from adult plants in semisolid medium and temporary immersion bioreactor. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 145(3), 641–648. <https://doi.org/10.1007/s11240-021-02034-1>
- Andres, F., Barco, U., de Los, M., Bernal, Á., da Veiga, P., Pilar, N., Gonzalez, V., & Moreno Herrera, A. (2020). *Temporary immersion system prototype in multiplication phase in the micropropagation of clon Williams Banana*.
- Ayuso Vilaboa, M. (2020). *In vitro culture of Eryngium viviparum: An endangered plant with therapeutic phytochemical potential* [Escola Internacional de Doutoramento].
<http://hdl.handle.net/11093/1913>

- Calvache, C., & Freire, J. (2019). *Diseño y desarrollo de un sistema de inmersión temporal semi-automatizado destinado a la micropropagación masal de especies vegetales* [Universidad de las Américas]. <http://dspace.udla.edu.ec/handle/33000/10611>
- Calviño, C. I., Martínez, S. G., & Downie, S. R. (2008). The evolutionary history of *Eryngium* (Apiaceae, Saniculoideae): Rapid radiations, long distance dispersals, and hybridizations. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *46*(3), 1129–1150.
<https://doi.org/10.1016/J.YMPEV.2007.10.021>
- Capote, I., Escalona, M., Daquinta, M., Pina, D., Gonzáles, J., & Aragon, C. (2009). Propagación in vitro de *Vriesea* en sistemas de inmersión temporal. *Biotecnología Vegetal*, *9*, 161–167.
- Castillo, A., Ashfield, R., Bentancor, M., Bentancor, L., Belén Bonilla, M., Ceppa, M., Franco, R., Silva, N., Cabrera, D., Rodríguez, P., & Zoppolo, R. (2019). Micropropagación de plantas en Biorreactores de Inmersión Temporal (BIT). *Biotecnología*, *56*, 88–91.
- Castillo, L., Moreno, A., & García, M. (2020). Efficiency of the Temporary Immersion System Versus the Conventional in Vitro Propagation Method. *Revista Metropolitana de Ciencias Aplicadas*, *3*(2), 3, 173–182.
<http://remca.umet.edu.ec/index.php/REMCA/article/view/284/315>
- Corporación financiera nacional. (2022). *Desarrollo sostenible*.
- Duban, A. (2018). *Estandarización de un sistema de inmersión temporal para la micropropagación de *Cattleya Schroederiae** [Universidad de Santander].
<https://repositorio.udes.edu.co/handle/001/1049>

- Echenique, V., Rubinstein, C., Hopp, E., Mroginski, L., & Levitus, G. (2019). *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal* (Vol. 2). Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.
- Escalona, M., Daquinta, M., Borroto, C., Lorenzo, J., Gonzáles, J., Gonzáles, B., & Desjardins, Y. (1999). Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems. *Plant Cell Reports*, *18*, 743–748.
- Espinosa, E., Herrera, L., Folgueras, M., Cabrera, M., Espinosa, A., & Fandiño, Y. (2011). Efecto depresivo de los agentes causales de las pudriciones secas en plantas producidas in vitro de malanga (*Xanthosoma sagittifolium*). *Cuba Rev. Colomb. Biotecnol*, *XIII*(2), 155–161.
- Expoflores. (2021). *Reporte anual de mercados de destino 2021*.
- Flores, J. (2018). *Estandarización de un protocolo de micropropagación de Papaya (Carica papaya L.) en un sistema de inmersión temporal de vasos gemelos (BIT)* [Universidad de las Américas]. <http://dspace.udla.edu.ec/handle/33000/9079>
- Fuentes, D., Chapis, E., & Chapis, E. (2019). Characteristics and use of the temporary immersion system in vitro propagation in the Bromeliaceae family. *Universidad y Sociedad*, *9*(2), 313–318. <http://scielo.sld.cu/pdf/rus/v11n3/2218-3620-rus-11-03-186.pdf>
- García-Ruiz, I. (2013). Contribución al conocimiento del género *Eryngium* (Apiaceae) en el estado de Michoacán, México. *Acta Botanica Mexicana*, *103*, 65–118.
- Goldenberg, R., Fiaschi, P., & Cardozo, A. (2021). *Eryngium* (Apiaceae, Saniculoideae) in the state of Paraná, southern Brazil. *Phytotaxa*, *12*.
<https://doi.org/10.11646/phytotaxa.507.1.1>

Goyes, J., & Rojas, Y. (2021). *Estandarización de un protocolo para la propagación in vitro de Vaccinium corymbosum (ARÁNDANO AZUL) empleando al técnica de inmersión temporal en biorreactores en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales Leplant de la ciudad de Ambato* [Escuela Superior Politécnica de Chimborazo].

<http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/14791>

Kikowska, M., Sliwiska, E., & Thiem, B. (2020). Micropropagation and Production of Somatic Seeds for Short-Term Storage of the Endangered Species *Eryngium alpinum* L. *Plants* 2020, Vol. 9, Page 498, 9(4), 498. <https://doi.org/10.3390/PLANTS9040498>

Luis, J., Rubio, A., & Hernández Hernández, J. (2019). Propagación comercial de plantas ornamentales por cultivo in vitro de tejidos vegetales para beneficio social de la comunidad. *IIESCA*, 1, 150–156.

Martin, K. P. (2008). Organogenesis on Root, Leaf, Stem-Disc, and Scape Explants of *Eryngium foetidum* L., a Rare Medicinal Plant.

Http://Dx.Doi.Org/10.1300/J044v11n04_02, 11(4), 9–17.

https://doi.org/10.1300/J044V11N04_02

Martre, P., Lacan, D., Just, D., & Teisson, C. (2001). Physiological effects of temporary immersion on *Hevea brasiliensis* callus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 67, 25–35.

Mengel, K., & Kirkby, E. (2000). *Principios de nutrición vegetal* (4ta ed., Vol. 2). Instituto Internacional del Potasio.

Mosqueda Frómata, O., Escalona Morgado, M. M., Teixeira da Silva, J. A., Pina Morgado, D. T., & Daquinta Gradaille, M. A. (2017). In vitro propagation of *Gerbera jamesonii*

- Bolus ex Hooker f. in a temporary immersion bioreactor. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 129(3), 543–551. <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1186-7>
- Muñoz, R. (2019). Diseño y construcción de un sistema de inmersión temporal de bajo costo para la propagación in vitro de plantas bajo el enfoque de una tecnología apropiable Design and construction of a low cost temporary immersion system for in vitro plant propagation un. *Tekhné*, 22, 60–79.
- Murrell, M., Flores, D., & Azofeifa, O. (2002). Establecimiento de un sistema de inmersión temporal para la micropropagación y el enraizamiento de *Bergenia* spp var. *Herbsblute. Tecnología En Marcha*, 15(4), 75–81.
- Navarrete, M. (2018). *Multipliación in vitro de Aristotélica chilensis en sistema de inmersión temporal SETIS* [Universidad de Talca]. <http://dspace.otalca.cl/handle/1950/11974>
- Olmos, S., Luciani, G., & Galdeano, E. (2019). Métodos de propagación y conservación de germoplasma. In *Bioteología y Mejoramiento Vegetal II* (Vol. 2, pp. 351–376).
- Quintero, I., Polo, J., Jarma, A., & Espitia, A. (2003). Enraizamiento in vitro de *Dioscoreas* sp. *Revista Colombiana de Bioteología*, 3, 51–56.
- Ramírez, M., Cruz, C., Cano, A., & Bello, J. (2019). Assessment of different temporary immersion systems in the micropropagation of anthurium (*Anthurium andreaum*). 3 *Biotech*, 9(8), 300–307. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1833-2>
- Regina, E., Lía Barbieri, R., Heiden, G., & Fischer, S. (2008). Potencialidade ornamental de espécies de *Eryngium* (Apiaceae) ocorrentes nos campos do rio grande do soul. *Magistra, Cruz Das Almas*, 20, 256–263.
<https://www.researchgate.net/publication/237609989>

Rivero, N., Quiala, E., Agramente, D., Barbón, R., Camacho, W., Morejón, L., & Pérez, M.

(2016). Empleo de sistemas de inmersión temporal para la multiplicación in vitro de brotes de *Anthurium andraeanum* Lind. var. Lambada | del Rivero Bautista |

Biotecnología Vegetal. *IBP*, 4(2).

<https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/393/html>

Robert, M. L., Herrera-Herrera, L., Herrera-Herrera, G., Ángel Herrera-Alamillo, M., &

Fuentes-Carrillo, P. (2006). Temporary immersion bioreactor system a new temporary immersion bioreactor system for micropropagation. *Methods in Molecular Biology*,

318, 121–130.

Roca, W., & Mroginski, L. (2006). *Cultivo de Tejidos en la Agricultura* (Vol. 1). Centro

Internacional de Agricultura Tropical.

Rodrigues, T. L. M., Silva, M. E. P., Gurgel, E. S. C., Oliveira, M. S., & Lucas, F. C. A.

(2022). *Eryngium foetidum* L. (Apiaceae): A Literature Review of Traditional Uses, Chemical Composition, and Pharmacological Activities. *Evidence-Based*

Complementary and Alternative Medicine, 2022, 1–15.

<https://doi.org/10.1155/2022/2896895>

Rojas, S., García, J., & Alarcón, M. (2006). *Propagacion Asexual de Plants* (Vol. 3).

https://books.google.com.ec/books?id=IK_KuQR9H8AC&pg=PA32&dq=organogenesis+directa&hl=es-

[419&sa=X&ved=2ahUKEwjemcmHkYj3AhXYSzABHVU_DFQQ6AF6BAgLEAI#v=onepage&q=organogenesis+directa&f=false](https://books.google.com.ec/books?id=IK_KuQR9H8AC&pg=PA32&dq=organogenesis+directa&hl=es-419&sa=X&ved=2ahUKEwjemcmHkYj3AhXYSzABHVU_DFQQ6AF6BAgLEAI#v=onepage&q=organogenesis+directa&f=false)

- Sánchez, J., Daquinta, M., & Capote, I. (2010). Multiplicación in vitro de brotes de tres variedades de callas (*Zantedeschia* sp.) empleando un sistema de inmersión temporal. *Ciencia y Tecnología*, 3, 1–5.
- Suárez, I. (2020). *Cultivo de Tejidos Vegetales* (Vol. 4). Fondo Editorial Universidad de Córdoba.
- Tirado, J., Naranjo, E., & Atehortúa, L. (2005). In vitro propagation of *Phalaenopsis* (Orchidaceae) from protocorms, using the temporary immersion system “RITA.” *Revista Colombiana de Biotecnología*, 1, 25–31.
- Tonato, L. (2021). *Estandarización del protocolo de micropropagación in vitro de Eryngium (eryngium maritimum) a partir de meristemos axilares en la Empresa LePlant* [Universidad Técnica de Ambato].
<https://repositorio.uta.edu.ec/jspui/handle/123456789/32127>
- Wang, P., Su, Z., Yuan, W., Deng, G., & Li, S. (2012). Phytochemical constituents and pharmacological activities of *Eryngium* L. (Apiaceae). *Faculty Publications*.

Apéndices