



Optimización del proceso de propagación *in vitro* de la especie *Limonium altaica* x *Limonium latifolia* variedad Supreme White en la Sede de Desarrollo Tecnológico e Innovación de la Universidad de Antioquia.

Daniela Giraldo Duque

Informe de práctica como requisito para optar al
título de: Ingeniera Bioquímica

Asesora

Blanca Mercedes Leguizamo Betancourth, Doctor (PhD) en Genética.

Universidad de Antioquia
Facultad de Ingeniería
Programa de Ingeniería Bioquímica
El Carmen de Viboral, Antioquia, Colombia
2023

Cita	Giraldo Duque [1]
Referencia	[1] D. Giraldo Duque, “optimización del proceso de propagación in vitro de la especie <i>Limonium altaica</i> x <i>L. latifolia</i> variedad supreme White en la Sede de Desarrollo Tecnológico e Innovación de la Universidad de Antioquia”, Practica empresarial, ingeniería Bioquímica, Universidad de Antioquia, El Carmen de Viboral, 2022.
Estilo IEEE (2020)	



Sede De Desarrollo Tecnológico e Innovación de la Universidad de Antioquia



Centro de Documentación Ingeniería (CENDOI)

Repositorio Institucional: <http://bibliotecadigital.udea.edu.co>

Universidad de Antioquia - www.udea.edu.co

Rector: John Jairo Arboleda Céspedes.

Decano/Director: Julio César Saldarriaga Molina.

Jefe departamento: Lina María Gonzáles Rodríguez.

El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Antioquia ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por los derechos de autor y conexos.

Dedicatoria

A mi madre y hermano por su apoyo incondicional, por alentarme a seguir, por darme la oportunidad de culminar esta etapa de mi vida y siempre creer en mí, insistiendo en este camino tan arduo, pero infinitamente gratificante de la educación superior.

Agradecimientos

De manera sincera y especial doy mis más profundos agradecimientos a la Sede de Desarrollo Tecnológico e Innovación de la Universidad de Antioquia y a la Fundación Universitaria, por permitirme afianzar mis conocimientos en el campo de propagación masiva de plantas por métodos biotecnológicos y retarme en campos del conocimiento que no conocía, y sin lugar a duda gracias a mi asesora Blanca M. Leguízamo Betancourth por llevar esta investigación a un nivel superior y por su apoyo incondicional.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	9
ABSTRACT	10
1. INTRODUCCIÓN	11
2. OBJETIVOS	13
2.1 Objetivo general	13
2.2 Objetivos específicos	13
3. MARCO TEÓRICO	14
3.1 Floricultura en Colombia y el mundo	13
3.2 Taxonoma y morfología del género de Limonium	13
3.3 Requerimientos edafoclimáticos del Limonium	13
3.4 Propagación vegetal convencional	13
3.5 Biotecnología y cultivo de tejidos vegetales	13
4. METODOLOGÍA	18
4.1 Fase 0: Selección del material vegetal madre	13
4.2 Fase I: Establecimiento (introducción)	13
4.3 Fase II: Multiplicación	20
4.4 Fase III: Enraizamiento	13
4.5 Fase IV: Aclimatación / endurecimiento	23
5. RESULTADOS	25
5.1 Fase I: Establecimiento (introducción)	25
5.2 Fase II: Multiplicación	25
5.3 Fase III: Enraizamiento	28
5.4 Fase IV: Aclimatación / endurecimiento	30

6. ANÁLISIS	34
6.1 Fase II: Multiplicación	34
6.2 Fase III: Enraizamiento	36
6.3 Fase IV: Aclimatación / endurecimiento	37
7. CONCLUSIONES	39
8. RECOMENDACIONES	41
9. REFERENCIAS	42

LISTA DE TABLAS

TABLA I COMPOSICIÓN MEDIO DE CULTIVO UTILIZADO DURANTE LA INTRODUCCIÓN	19
TABLA II COMPOSICIÓN MEDIOS DE CULTIVO DURANTE LA FASE DE MULTIPLICACIÓN	20
TABLA III CONDICIONES AMBIENTALES DE CAMARA DE CRECIMIENTO	21
TABLA IV COMPOSICIÓN MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS DURANTE LA FASE DE ENRAIZAMIENTO	23
TABLA V COEFICIENTE DE MULTIPLICACIÓN DURANTE PRIMER Y SEGUNDO SUBCULTIVO	25
TABLA VI ANÁLISIS DE VARIANZA PARA EL COEFICIENTE DE MULTIPLICACIÓN	26
TABLA VII PRUEBAS DE MULTIPLES RANGOS PARA COEFICIENTE DE MULTIPLICACIÓN	26
TABLA VIII PRUEBAS DE MULTIPLES RANGOS PARA COEFICIENTE DE MULTIPLICACIÓN	27

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Instrumentos de medición de las condiciones ambientales de la cámara de crecimiento	22
Figura 2 Desarrollo de vitroplantas de <i>Limonium altaica x Limonium latifolia</i> variedad Supreme White durante la fase de multiplicación	28
Figura 3 Fase de enraizamiento de vitroplantas de <i>Limonium altaica x Limonium latifolia</i> variedad Supreme White	29
Figura 4 Porcentaje de vitroplantas <i>Limonium altaica x Limonium latifolia</i> variedad Supreme White durante la fase de enraizamiento	29
Figura 5 Vitroplantas de <i>Limonium altaica x Limonium latifolia</i> variedad Supreme White enraizadas en los medios de enraizamientos	30
Figura 6 Proceso de aclimatación / endurecimiento de vitroplantas <i>Limonium altaica x Limonium latifolia</i> variedad Supreme White	31
Figura 7 Porcentaje de supervivencia de vitroplantas <i>Limonium altaica x Limonium latifolia</i> variedad Supreme White a la fase de aclimatación	31
Figura 8 Largo de las hojas de plantas de <i>L. altaica x Limonium latifolia</i> variedad Supreme White en cada tipo de sustrato durante la fase de aclimatación/endurecimiento	32
Figura 9 Numero de hojas desarrolladas en plantas de <i>L. altaica x Limonium latifolia</i> variedad Supreme White durante la fase de aclimatación / endurecimiento en cada sustrato	33

SIGLAS, ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

CTV	Cultivo de tejidos vegetales
L	Limonium
HCL	Ácido clorhídrico
M&S	Murashige y Skoog
6-BAP	Bencilaminopurina
PPFD	Photo period flux density
IBA	Ácido indolbutírico
PhD	Philosophiae Doctor
ANA	Ácido naftalenacético
PPM	Plant preservation mixture
GL	Grados de libertad

RESUMEN

El avance de las ciencias biológicas ha desarrollado estudios detallados, tanto a nivel celular como molecular, y actualmente en condiciones de laboratorio es posible reproducir todos los factores que pueden incidir en el crecimiento y desarrollo de las plantas. en el cultivo *in vitro* de plantas, se aprovecha el principio de que las células vegetales poseen totipotencialidad, quiere decir que son capaces generar una nueva planta a partir de explantes o tejidos vegetales. Este trabajo tuvo como objetivo optimizar un protocolo de propagación *in vitro* previamente existente en la Sede de Desarrollo Tecnológico e Innovación de la Universidad de Antioquia para la especie *Limonium altaica x L. latifolia* variedad Supreme White, de la empresa Flores Ubaté ubicada en el municipio de Chía, Cundinamarca por medio de cultivo de tejidos vegetales (CTV) con el fin de mejorar los procesos de producción masiva de esta variedad.

Inicialmente en la micropropagación de Supreme White se realizó la elección de plantas madre previamente seleccionadas, las cuales fueron utilizadas para la toma de explantes e introducción en medio de cultivo previamente estandarizado. Posteriormente, durante la fase de multiplicación, se evaluó el desarrollo de las vitroplantas en diferentes medios de cultivos. Con este ensayo fue posible identificar el mejor medio de cultivo, para las etapas de multiplicación y enraizamiento de Supreme White. Como resultado se pudo determinar que el medio de cultivo óptimo para la fase de multiplicación fue el medio 3, con 4,43 g.L⁻¹ de sales M & S con vitaminas, 0,05 mg.L⁻¹ de bencilaminopurina, 0,5 mg.L⁻¹ de pantotenato de calcio, 30 g.L⁻¹ de azúcar y 7 g.L⁻¹ de agar PTC. Cabe resaltar que este medio era el que presentaba menor concentración de reguladores de crecimiento, con respecto a los otros medios. Para la fase enraizamiento el medio en el cual se presenta un mejor desarrollo radicular fue el medio 1 conformado por 4,43 g.L⁻¹ de sales M & S con vitaminas, 0,5 mg.L⁻¹ de indo 3 – butírico 1 mg.L⁻¹ de pantotenato de calcio, , 15 g.L⁻¹ de azúcar, 7 g.L⁻¹ de agar PTC, 1 mg.L⁻¹ de ácido naftalenoacetico y 1 ml.L⁻¹ de Plant preservation mixture , ya que hubo un mejor desarrollo radicular, con raíces más cortas y gruesas y presencia de pelos absorbentes, permitiendo un mayor éxito en la fase de aclimatación en el sustrato de coco.

Palabras clave: *Limonium altaica x L. latifolia* variedad Supreme White, cultivo de tejidos vegetales, medios de cultivo, propagación *in vitro*, vitroplantas.

ABSTRACT

The advancement of biological sciences has developed detailed studies, both at the cellular and molecular level, and currently under laboratory conditions it is possible to reproduce all the factors that can affect the growth and development of plants. This is the general principle that applies to the *in vitro* cultivation of plants, which have totipotent cells, which are capable of reproducing their growth and generating a new plant from explants or plant tissues. The objective of this work was to optimize a previously existing *in vitro* propagation protocol at the Technological Development and Innovation Headquarters of the University of Antioquia for the species *Limonium altaica* x *L. latifolia* variety Supreme White, from the Flores Ubaté company located in the municipality of Chía, Cundinamarca by means of plant tissue culture (CTV) in order to improve the mass production processes of this variety.

Initially, the Supreme White micropropagation was carried out by selecting previously selected mother plants, which were used to take explants and introduce them into a previously standardized culture medium. Subsequently, during the multiplication phase, the evaluation of the development of the vitroplants in different culture media was carried out. With this test it was possible to identify the choice of the best culture medium for the multiplication and rooting stages of Supreme White. As a result, it was possible to determine that the optimal culture medium for the multiplication phase was medium 3, with 4.43 g.L⁻¹ of M & S salts with vitamins, 0.05 mg.L⁻¹ of benzylaminopurine, 0.5 mg.L⁻¹ of calcium pantothenate, 30 g.L⁻¹ of sugar and 7 g.L⁻¹ of PTC agar. It should be noted that this medium was the one with the lowest concentration of growth hormones, compared to the other mediums. For the rooting phase, the medium in which a better root development is presented was medium 1 made up of 4.43 g.L⁻¹ of M & S salts with vitamins, 0.5 mg.L⁻¹ of indo 3 – butyric acid 1 mg .L⁻¹ of calcium pantothenate, 15 g.L⁻¹ of sugar, 7 g.L⁻¹ of PTC agar, 1 mg.L⁻¹ of naphthaleneacetic acid and 1 ml.L⁻¹ of Plant preservation mixture, since there was a better root development, with shorter and thicker roots and the presence of absorbent hairs, allowing greater success in the acclimatization phase in the coconut substrate.

Keywords: *Limonium altaica* x *L. latifolia* variety Supreme White, plant tissue culture, culture media, *in vitro* propagation, vitroplants.

1. INTRODUCCIÓN

Colombia se caracteriza por ser un país con una gran diversidad de plantas ornamentales muchas de estas de gran interés en la floricultura, debido a las condiciones favorables como lo son su ubicación geográfica, calidad de los suelos, mano de obra, el clima, la tecnología, la existencia del mercado externo y la cercanía al mercado objetivo que han permitido la producción agrícola de exportación. Este país se sitúa actualmente como el segundo exportador de flores en el mundo con una amplia oferta de flores entre las cuales se encuentran las rosas, los claveles, alstroemerias, crisantemos, heliconias y anturios, además de los follajes que también hacen parte del catálogo de exportación del país [1].

La participación de Colombia en el mercado floricultor ha sido importante y ha traído nuevos estándares de productividad y competitividad expresados en la calidad, color, tamaño y diversidad en los tipos de flores, convirtiéndose esta última en un principio diferenciador. Los retos que enfrenta el mercado de dicho producto están definidos tanto por las particularidades de la cultura, como por la localización climática de cada país [2].

La tendencia actual de los mercados extranjeros es la compra de bouquets (flores del bosque), mercado que día a día crece como estrategia para aumentar el consumo de flores durante el año [7]. La combinación de especies y colores variados tiene aceptación en el mercado internacional y le da valor agregado al producto final, razón por la cual las empresas floricultoras requieren de varias especies, dentro de las cuales están las especies del género *Limonium* spp [3].

El género *Limonium* pertenece a la Familia de las plumbagináceas y está representado por cerca de 300 especies, de las cuales aproximadamente 20 tienen usos comerciales. Esta especie es muy apreciada porque tiene buen mercado tanto para flor seca como para flor en fresco. Estas plantas poseen inflorescencias que se utilizan solas o en combinación con otras para formar bouquets, tienen gran duración en florero y su color se preserva naturalmente en gran medida al pasar del estado fresco al estado deshidratado [3]. Diferentes variedades de estas especies poco a poco, se han ido produciendo como flor cortada en Japón y los Países Bajos con un avance en las técnicas de propagación masiva utilizando el cultivo de tejidos vegetales-CTV [4].

El CTV se basa en el aislamiento de órganos, tejidos o células vegetales y en el ajuste de las condiciones necesarias para la obtención de respuestas fisiológicas o morfológicas a partir de

estos explantes. El término de propagación *in vitro* o micropropagación se utiliza para referirse al establecimiento, multiplicación y posterior enraizamiento *in vitro* de las plantas obtenidas. Los experimentos de micropropagación se basan en la selección de explantes que contienen yemas apicales o axilares y en el empleo de condiciones de cultivo que promueven la formación de brotes a partir de estas yemas [6].

En la Sede Desarrollo Tecnológico e Innovación de la Universidad de Antioquia, actualmente se llevan a cabo procesos de propagación vegetal *in vitro* de algunas especies de plantas, dentro de las cuales se encuentra, la propagación *in vitro* de la especie *L. altaica x L. latifolia* variedad Supreme White. El protocolo de propagación de esta variedad actualmente presenta algunos inconvenientes debido a que su forma de roseta estimula el desarrollo microbiano y dificulta la individualización de las plantas durante el proceso *in vitro*. Además, en la etapa de enraizamiento se ha observado previamente una necrosis radicular parcial. Esto, algunas veces genera pérdidas del material vegetal, insumos, tiempos, atrasos en los programas de producción, entre otros. Por tal motivo, con este trabajo de investigación, se buscó optimizar las etapas de multiplicación y enraizamiento en el protocolo de propagación *in vitro* de la especie. *L. altaica x L. latifolia* variedad Supreme White para la producción masiva con fines comerciales en la Sede de Desarrollo Tecnológico e Innovación de la Universidad de Antioquia.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Optimizar las etapas de multiplicación y enraizamiento en el proceso de propagación *in vitro* de la especie *L. altaica x L. latifolia* variedad Supreme White para la producción masiva con fines comerciales en la Sede de Desarrollo tecnológico e innovación de la Universidad de Antioquia.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar la mejor combinación entre medio de cultivo y luminosidad para el desarrollo y aumento del coeficiente de multiplicación de la especie *L. altaica x L. latifolia* variedad Supreme White.
- Establecer el medio de cultivo vegetal propicio que permita el enraizamiento exitoso de plantas la especie *L. altaica x L. latifolia* variedad Supreme White y su posterior supervivencia en la fase de aclimatación.
- Identificar el sustrato adecuado para el proceso de aclimatación y endurecimiento de vitroplantas de la especie *L. altaica x L. latifolia var* Supreme White.
- Establecer una relación entre el medio de cultivo de enraizamiento y el sustrato de aclimatación en el porcentaje de supervivencia de las vitroplantas.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Floricultura en Colombia y el mundo

La industria de la floricultura en Colombia es una de las más prometedoras dentro del sector agropecuario, y establece una producción destinada a mercados extranjeros principalmente a los Estados Unidos [3]. Así, la combinación de especies y colores variados tiene aceptación en el mercado internacional y le da valor agregado al producto final, razón por la cual las empresas floricultoras requieren de varias especies, dentro de las cuales están las especies del género *Limonium* spp [3]. Por ejemplo, la especie *Limonium sinuatum*, se caracteriza por el color vigoroso de sus flores, y actualmente es una de las especies que se está produciendo a nivel comercial en los Estados Unidos, tanto en California como en Florida [6]. En un gran número de países, se lleva a cabo la plantación de limonium en ciertas estaciones, garantizando el buen desarrollo y las condiciones climáticas requeridas. Por ejemplo, en Europa occidental es muy común plantarse desde diciembre hasta abril, para obtener flores en verano, en la zona mediterránea la plantación se realiza a finales de verano, y así favorecer la cosecha en invierno, así mismo como en la zona de Sudamérica [5].

3.2 Taxonomía y morfología del género de *Limonium*

El género *Limonium* pertenece a la familia Plumbaginácea y está representado por cerca de 300 especies, de las cuales aproximadamente 20 son usadas para fines comerciales [3]. Esta especie es muy apreciada porque tiene buen mercado tanto para flor seca como para flor en fresco. El limonium presenta una gran complejidad taxonómica, lo que plantea ciertos problemas para su identificación. A lo que se le debe añadir la elevada tasa de hibridación que se produce entre los individuos [12].

La mayoría de las especies son plantas perennes (que viven durante más de dos años) y forman rosetas basales cortamente diferenciadas. En algunas ocasiones presentan tallos robustos portadores de hojas esparcidas helicoidalmente que pueden elevarse unos decímetros, y a veces pueden llegar a alcanzar los tres metros. Además, pueden hallarse plantas anuales de ciclo

estacional como *L. echioides* y *L. lobatum*. Es de destacar también que la forma de las hojas puede variar entre las lobuladas y las enteras [4].

La forma de la inflorescencia del *Limonium* está agrupada en forma de espigas, formadas por un conjunto de dos o más flores cuyo color de sus pétalos puede variar entre color violeta, blancas o rosadas. Las espiguillas están rodeadas de tres brácteas (órgano foliáceo): externa, media e interna. [15].

3.3 Requerimientos edafoclimáticos del *Limonium*

Con el fin de obtener un buen desarrollo en la producción del *Limonium*, es necesario que estas plantas tengan ciertas condiciones ambientales que le permitan un buen crecimiento y progreso. La temperatura, por ejemplo, es una de las condiciones importantes para el crecimiento y floración. Durante el día la temperatura debe estar en un rango entre 22 a 27 °C y de 12 a 16 °C por la noche. Los hábitats de desarrollo de este género abarcan desde los saladares continentales y costeros (con altas concentraciones de cloruros y sulfatos) [17], hasta las zonas peninsulares del interior con climatología más fría. Sin embargo, se ha notado que esta especie ha desarrollado la capacidad de ser resistentes a ambientes secos con halotolerancia. Estas especies se pueden cultivar en cualquier tipo de suelo, siempre que cuente con buena permeabilidad y un buen drenaje. El pH adecuado para un buen desarrollo del cultivo está alrededor de 6,5 [6]. Adicionalmente, para la inducción floral es necesaria una diferencia como mínimo de 10°C entre el día y la noche. Además, es importante mantener controlada la humedad relativa para impedir enfermedades [6].

3.4 Propagación vegetal convencional

Las plantas se pueden multiplicar de dos maneras, vegetativamente (forma asexual, también llamado clonación) y de forma generativa (sexualmente, por semillas) [14]. La tasa de germinación de las semillas puede ser baja para algunas especies o variedades. Adicionalmente, la propagación por semilla sexual conlleva a una diversidad genética y fenotípica que no es deseable en cultivos comerciales. Cabe resaltar, que durante la propagación convencional las plantas suelen estar sujetas a “estreses” ambientales y al ataque de plagas y enfermedades, que pueden comprometer seriamente la calidad del producto final, que es el principal objetivo de los productores tanto para

comercialización en el mercado interno, así como para atender el exigente mercado de exportación [15]. Varios patógenos (bacterias, hongos y virus) afectan seriamente la productividad y calidad de flores y plantas ornamentales. Las bacterias y los hongos generalmente se pueden controlar de manera efectiva con la aplicación de pesticidas. Sin embargo, los virus, debido a su aparición sistémica, son difíciles de controlar. Afortunadamente, el cultivo de meristemos *in vitro*, ha favorecido la limpieza de numerosos virus y ha contribuido a mejorar los porcentajes de germinación incrementando el número de individuos en especies con problemas de reproducción o en poblaciones extremadamente reducidas [6] [16].

3.5 Biotecnología y Cultivo de Tejidos Vegetales

La biotecnología se define comúnmente como el uso de microorganismos vivos, o los productos de los mismos, para el beneficio humano, con el fin de desarrollar un producto o resolver un problema [9]. Una de las técnicas más utilizadas actualmente es el Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV) o micropropagación. En el CTV los tejidos o explantes vegetales como células, tejidos, órganos, embriones, protoplastos o semillas son sembrados en un medio de cultivo que proporciona todos los nutrientes (macros y micronutrientes) y reguladores de crecimiento (similares a hormonas vegetales como las citoquininas, auxinas, giberelinas, ácido abscísico, entre otros) bajo condiciones ambientales controladas como la temperatura, la humedad y el fotoperiodo generando un entorno de cultivo ideal para su buen desarrollo [12] [15]. La estrategia para obtener un producto vegetal *in vitro* óptimo depende de lograr un sistema que permita la selección de material en campo con excelentes condiciones agronómicas y, posteriormente, desarrollar un protocolo de laboratorio que en cada una de sus fases introducción, multiplicación, enraizamiento y endurecimiento, conduzca a producir material vegetal de excelente calidad sanitaria, genética y fisiológica [3].

Las aplicaciones de las técnicas del CTV son muy amplias y han demostrado ser una herramienta indispensable en muchos campos, permitiendo la obtención de células y plantas bajo condiciones experimentales, así como la capacidad de propagar y almacenar masivamente plantas *in vitro* de interés comercial o ecológico [9]. Esta técnica permite la obtención de plantas idénticas o “clonación” lo cual consiste en la propagación *in vitro* de un gran número de plantas seleccionadas con el mismo genotipo que su planta madre [13]. Adicionalmente, el CTV permite la eliminación de enfermedades, el aislamiento de protoplastos para la producción de

híbridos, cultivo de embriones, producción de sustancias botánicas, selección y mutación celular, estudios de anatomía, desarrollo y nutrición vegetal fundamental, biotecnología vegetal, embriogénesis somática, producción de semillas sintéticas, cultivo de callos, y el cultivo de flores [13].

En el sector floricultor, el uso de la micropropagación ha permitido realizar introducciones rápidas y la propagación masiva de nuevas especies y variedades ornamentales obteniéndose plantas libres de plagas y enfermedades (Boon, 1991). Este es el caso de plantas del género *Limonium*, para las cuales la micropropagación ha funcionado como una herramienta para la obtención rápida de grandes cantidades de individuos y sus flores para el mercado [3]. Previamente han sido estandarizados protocolos de propagación para diferentes especies de *Limonium* spp. como *L. sinuatum* (Harazy, 1985) y para algunos híbridos interespecíficos de *L. caspia*, *L. otolepis*, *L. dumosum* (Ruffoni y Mascarello, 2000).

En Colombia, por ejemplo, la propagación de la variedad “Misty blue” de *Limonium* se hace a partir de la introducción al laboratorio de yemas florales, las cuales pasan por un proceso de desinfección, para luego obtener plántulas que serán la base para la multiplicación. Esta variedad presenta problemas para la multiplicación *in vitro* a causa de la utilización de protocolos que normalmente se utilizan para otros clones; por ejemplo, las tasas de multiplicación son bajas (1,5 brotes en cuatro semanas), lo que no permite disponer del volumen de plantas deseado en corto tiempo, Además, presenta un bajo enraizamiento o en algunos casos no hay formación de raíces [3].

4. METODOLOGÍA

Con el fin de optimizar las fases de multiplicación, enraizamiento y aclimatación de un protocolo de propagación *in vitro* de la especie *L. altaica* x *L. latifolia* var. Supreme White se realizaron los ensayos descritos a continuación durante cada una de las fases del CTV. Con esta investigación se buscó lograr un mayor coeficiente de multiplicación en el menor tiempo posible, un mayor porcentaje de enraizamiento y un mayor porcentaje de supervivencia a la aclimatación de esta variedad.

4.1 Fase 0: Selección del material vegetal madre.

En la finca de la empresa Flores Ubaté S.A.S, ubicada en el municipio de Chía, Cundinamarca, el personal técnico de dicha empresa realizó la selección de plantas madre con base a sus características de interés comercial para el mercado (color y tamaño de las flores, altura de pedúnculos de las inflorescencias, etc). La empresa realizó el envío de inflorescencias inmaduras y/o plantas enteras hasta la Sede de Desarrollo Tecnológico e Innovación de la Universidad de Antioquia. De ese material vegetal fueron seleccionados botones florales inmaduros o aún sin abrir (que no se observaran las brácteas coloridas) y/o yemas laterales o apicales que se encontraran en la base de las plantas. Una vez fue seleccionado el material vegetal de partida, estos fueron codificados e identificados.

4.2 Fase I: Establecimiento (introducción)

Para la preparación de todos los medios de cultivo, se agregaron todos los componentes en un beaker con agua desionizada, a excepción del gelificante (Agar PTC). El pH fue ajustado con hidróxido de sodio 1 M o HCl según necesidad y posteriormente agregado el gelificante. Los medios fueron llevado a punto de ebullición y posteriormente dispensados para finalmente ser esterilizados en autoclave a 121 °C y 15 psi durante 20 minutos.

Antes de dar inicio al proceso de introducción del material vegetal, el medio de introducción previamente estandarizado en la Sede fue preparado una semana antes de la siembra para observar

posible crecimiento microbiano y poder descartarlo en caso de contaminación (tabla 1). De este medio fueron dispensados 3 ml por tubo de ensayo y fue sembrado un meristemo por tubo de ensayo.

TABLA I
COMPOSICIÓN MEDIO DE CULTIVO UTILIZADO DURANTE LA INTRODUCCIÓN

Composición	Cantidad
Sales Murashige y Skoog - M&S (1962) con vitaminas	4,43 g.L ⁻¹
Bencilaminopurina (6- BAP)	0,2 mg.L ⁻¹
Ácido 1- naftalenoacético (ANA)	0,1 mg.L ⁻¹
Pantotenato de calcio	1,0 mg.L ⁻¹
Azúcar	30 g.L ⁻¹
Agar plant tissue Culture (Agar PTC)	7,0 g.L ⁻¹
Ph	5,8

Tras revisar cuidadosamente el material vegetal (presencia de plagas o síntomas de enfermedad), este se seccionó en los entrenudos y fueron retiradas las hojas con cuidado de no dañar las yemas. Posteriormente, este material vegetal fue lavado con jabón neutro y agua corriente hasta retirar completamente el jabón.

Posteriormente se ingresó el material vegetal lavado al laboratorio y en cabina de flujo laminar fue realizado el proceso de desinfección lavándolo con etanol al 70% durante 1 min. Enseguida, se realizó un lavado con hipoclorito de sodio al 2% durante 5 min y tres enjuagues con agua desionizada estéril. Para la siembra de los meristemas en cabina de flujo laminar y con ayuda de un estereoscopio, fueron retirados los primordios foliares con el fin de dejar los meristemas “desnudos”, y posteriormente sembrarlos en el medio de cultivo de introducción. Los tubos de ensayo que contenían los meristemas se ubicaron en gradillas y se trasladaron a cámara oscura en donde se mantuvieron durante 2 semanas. Cumplido este tiempo, el material fue trasladado a una cámara de crecimiento con fotoperiodo de (16 h luz/8 horas oscuridad) y un rango de temperatura (18-22°C) por un periodo de 2 semanas adicionales a la fase de oscuridad. Se realizó seguimiento

semanal durante esta fase para descartar contaminaciones, necrosis o pérdidas por la no formación de vitroplantas.

4.3 Fase II: Multiplicación

Una vez pasadas 4 semanas a partir de la introducción, se realizó la transferencia de las primeras vitroplantas para frascos de 5 cm de alto (tipo compota) con aproximadamente 20 ml de medios de cultivo de multiplicación. En esta fase fueron ensayados tres medios de cultivo diferentes (tabla 2). Para esto, en cámara de flujo laminar fueron retiradas las vitroplantas de los tubos de ensayo y colocadas en platos metálicos previamente esterilizados para retirar tejidos necrosados o muertos y para separar brotes o plantas nuevas con ayuda de pinzas y bisturí estériles.

TABLA II
COMPOSICIÓN MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS DURANTE LA FASE DE MULTIPLICACIÓN

Composición	Concentración final		
	Medio 1	Medio 2	Medio 3
Sales M&S con vitaminas	4,43 g.L ⁻¹	4,43 g.L ⁻¹	4,43 g.L ⁻¹
Bencilaminopurina (6- BAP)	0,5 mg.L ⁻¹	0,2 mg.L ⁻¹	0,05 mg.L ⁻¹
Pantotenato de calcio	2,0 mg.L ⁻¹	2,0 mg.L ⁻¹	0,5 mg.L ⁻¹
Azúcar	30 g.L ⁻¹	30 g.L ⁻¹	30 g.L ⁻¹
Agar plant tissue Culture (Agar PTC)	7,0 g.L ⁻¹	7,0 g.L ⁻¹	7,0 g.L ⁻¹
Ph	5,8	5,8	5,8

Además, se evaluó el tipo de luz (Luz directa de luminaria tipo led y luz indirecta). En total fueron 6 unidades experimentales por cada medio de cultivo evaluado, cada unidad equivalía a un frasco compota con 5 vitroplantas.

Para la fase de multiplicación inicialmente se contó con un total de 90 vitroplantas. Transcurridas cuatro y ocho semanas a partir de la primera multiplicación se realizó el análisis con un enfoque cuantitativo, en donde la variable de respuesta fue el coeficiente de multiplicación de

las vitroplantas en el transcurso de su desarrollo. El coeficiente de multiplicación fue calculado con la siguiente fórmula:

$$\text{Coeficiente de multiplicación: } \frac{\text{Numero de explantes multiplicados}}{\text{Numero de explantes inicialmente sembrados}}$$

Posteriormente las vitroplantas fueron llevadas a cámara de crecimiento, manteniendo las variables y condiciones antes mencionadas. Se hizo inspección semanal del material vegetal con el fin de observar el desarrollo de los explantes y descartar aquellos que presentaran contaminación o que estuvieran necrosados.

TABLA III
CONDICIONES AMBIENTALES DE CAMARA DE CRECIMIENTO

Parámetro	Con luz natural	Con luz artificial
Temperatura (°C)	18 – 22	18– 22
Humedad relativa (%)	30 – 55	30 – 55
PPFD ($\mu\text{mol s m}^{-2}$)	19,88	79,45

*PPFD: Photo Period Flux Density

Las condiciones presentadas anteriormente fueron monitoreadas durante el desarrollo experimental en cada una de sus etapas, por medio de un datalogger Marca CEM USB – PRO Modelo DT-172 y un espectroradiómetro marca Li-cor modelo LI-180, con los cuales fue posible realizar las mediciones de temperatura, humedad relativa e intensidad lumínica respectivamente (figura 1).



Figura 1. Instrumentos de medición de las condiciones ambientales de la cámara de crecimiento. a. Datalogger, b. Espectroradiómetro.

4.4 Fase III: Enraizamiento

Finalizado el proceso de multiplicación fueron evaluados dos medios de cultivo diferentes para la fase de enraizamiento (tabla 4) con el fin de determinar en cual medio se presentaba un mejor desarrollo radicular de las plantas. El proceso de enraizamiento se realizó dentro de la cámara de flujo laminar. Las vitroplantas que se desarrollaron en los medios de multiplicación, fueron retiradas y puestas en los platos metálicos estériles para retirar el exceso de hojas y realizar los cortes necesarios hasta obtener los meristemas bien individualizados. Para este proceso se tuvieron en cuenta unos criterios de selección, los cuales fueron que las plantas se encontraran bien individualizada, es decir sin brotes, que contara como mínimo con 3 hojas laterales y ápice, y el tamaño de la planta formada estuviera entre 0,5 – 1,5 cm. Además, a la hora de realizar la siembra en los medios de cultivo de enraizamiento se clasifico por tamaño cada uno de los explantes con el propósito de obtener un desarrollo homogéneo de las mismas.

TABLA IV.
COMPOSICIÓN MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS DURANTE LA FASE DE ENRAIZAMIENTO

Composición	Concentración final	
	Medio 1	Medio 2
Sales M&S con vitaminas	4,43 g.L ⁻¹	4,43 g.L ⁻¹
Ácido indolbutírico (IBA)	0,5 mg.L ⁻¹	0,5 mg.L ⁻¹
Pantotenato de calcio	1,0 mg.L ⁻¹	1,0 mg.L ⁻¹
Azúcar	15 g.L ⁻¹	15 g.L ⁻¹
Agar plant tissue Culture (Agar PTC)	7,0 g.L ⁻¹	7,0 g.L ⁻¹
Ácido naftalenacético (ANA)	1 mg.L ⁻¹	1 mg.L ⁻¹
Carbón activado	-	1 g.L ⁻¹
Plant preservation mixture (PPM)	1 ml.L ⁻¹	1 ml.L ⁻¹
Ph	5,8	5,8

El enfoque del análisis fue cualitativo, y la variable de respuesta fue el porcentaje de individuos enraizados. La toma de datos se realizó cuatro semanas después de la siembra. El porcentaje de individuos enraizados fue determinado con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de individuos enraizados: } \frac{\text{Numero de plantas sembradas}}{\text{Numero de plantas enraizadas}}$$

4.5 Fase IV: Aclimatación/endurecimiento

Una vez cumplido el ciclo de enraizamiento, los frascos con las vitroplantas fueron trasladados para el área de “*producto terminado*” de la Sede en donde fueron expuestas a las condiciones *ex vitro*. Inicialmente se realizó un lavado cuidadoso de las raíces de las vitroplantas con agua corriente con el fin de retirar el exceso de medio de cultivo. Posteriormente, las plantas fueron trasladadas para el área de invernaderos con el fin de realizar la respectiva siembra. Durante esta fase fueron evaluados dos tipos de sustrato (turba y sustrato de coco) y el número de plantas utilizadas dependió de la cantidad de vitroplantas sobrevivientes al proceso de enraizamiento. La siembra fue realizada en bandejas de germinación con los sustratos previamente hidratados. Estas

plantas en las respectivas bandejas fueron mantenidas en condiciones de cámara húmeda durante 4 semanas con riegos diarios para mantener una alta humedad relativa y transcurridos 18 días fue evaluado el porcentaje de sobrevivencia. Para este ensayo se tuvo un enfoque cualitativo y el porcentaje de éxito de sobrevivencia fue calculado con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Exito de supervivencia: } \frac{\text{Numero de plantas sembradas}}{\text{Numero de plantas sobrevivientes}}$$

5. RESULTADOS

5.1 Fase I: introducción.

El proceso de introducción del material vegetal fue realizado previamente por los técnicos de la Sede y obtuvieron un alto número de plantas con las cuales se dio continuidad a los procesos productivos y a los ensayos que son descritos en este trabajo.

5.2 Fase II: Multiplicación.

Una vez se realizaron los subcultivos en la fase de multiplicación fueron obtenidos los coeficientes de multiplicación observados en la tabla V. Durante el desarrollo de esta etapa de micropropagación, se obtuvo un mayor coeficiente de multiplicación en el medio 2 y 3 con luz artificial + natural.

TABLA V
COEFICIENTE DE MULTIPLICACIÓN DURANTE EL PRIMER Y SEGUNDO SUBCULTIVO

Medios de cultivo	Coeficiente de multiplicación durante el <i>primer subcultivo</i>		Coeficiente de multiplicación durante el <i>segundo subcultivo</i>		Coeficiente de multiplicación global	
	Luz Natural	Luz artificial + natural	Luz natural	Luz artificial + natural	Luz natural	Luz artificial + natural
Medio 1	1,3	1,3	1,7	1,5	2,0	2,0
Medio 2	1,9	2,0	1,5	1,9	3,0	3,8
Medio 3	1,7	2,0	2,0	1,7	3,3	3,5

De acuerdo con los resultados estadísticos observados en la tabla VI, entre los factores “luz natural” y “luz natural + artificial” no hay diferencias estadísticamente significativas. El factor categórico “medio de cultivo” si presentó un efecto estadísticamente significativo (valor-p < 0,05) sobre la variable de respuesta correspondiente al coeficiente de multiplicación, con un 95 % de nivel de confianza (tabla VI).

Tabla VI
ANÁLISIS DE VARIANZA PARA EL COEFICIENTE DE MULTIPLICACIÓN

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón F	Valor P
Efectos principales					
A: Medio	8.21778	2	4.10889	4.37	0.0375
B: Luz	0.435556	1	0.435556	0.46	0.5090
Interacciones					
AB	0.4311111	2	0.215556	0.23	0.7985
Residuos	11.28	12	0.94		
Total (corregido)	20.3644	17			

En cuanto a las pruebas de múltiples rangos (tablas VII Y VIII), en donde se aplica un proceso de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras, se observa en una de las columnas las diferencias estimadas entre cada par de medias para el factor medios, para discriminar entre ellas la diferencia mínima significativa. Por lo tanto Se logró estipular que entre el medio 1 y 2 se presenta una diferencia significativa, con un nivel del 95 % de confianza, al igual que entre el medio 1 y 3. Mientras que entre el medio 2 y 3 no se presenta diferencias estadísticamente significativas, debido a que se han identificado como dos grupos homogéneos.

Tabla VII
PRUEBAS DE MULTIPLES RANGOS PARA COEFICIENTE DE MULTIPLICACIÓN

Medio	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos homogéneos
M1	6	2,0	0,395811	
M3	6	3,43333	0,395811	X
M2	6	3,43333	0,395811	X

Tabla VIII
PRUEBAS DE MUYLTIPLES RANGOS PARA COEFICIENTE DE MULTIPLICACIÓN

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Limites
M1 – M2	*	-1,43333	1,21962
M1 – M3	*	-1,43333	1,21962
M2 – M3		0	1,21962

Como se observa en la figura 2, se muestra el desarrollo de las vitroplantas en la fase de multiplicación en cada uno de sus medios y con el factor luz natural y artificial. La mayor diferencia presente es en el medio 1 las vitroplantas presentan un menor desarrollo, presentándose hojas más pequeñas y aglomeradas. Aunque no se identificó una diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos con “luz natural” y “luz natural + artificial”, al compararse visualmente las plantas que se desarrollaron con luz natural + artificial con aquellas que crecieron solamente con luz natural se observó que las hojas de las primeras plantas estaban más pequeñas, mientras que las segundas presentaron un mayor número de hojas y de mayor longitud (figura 6).

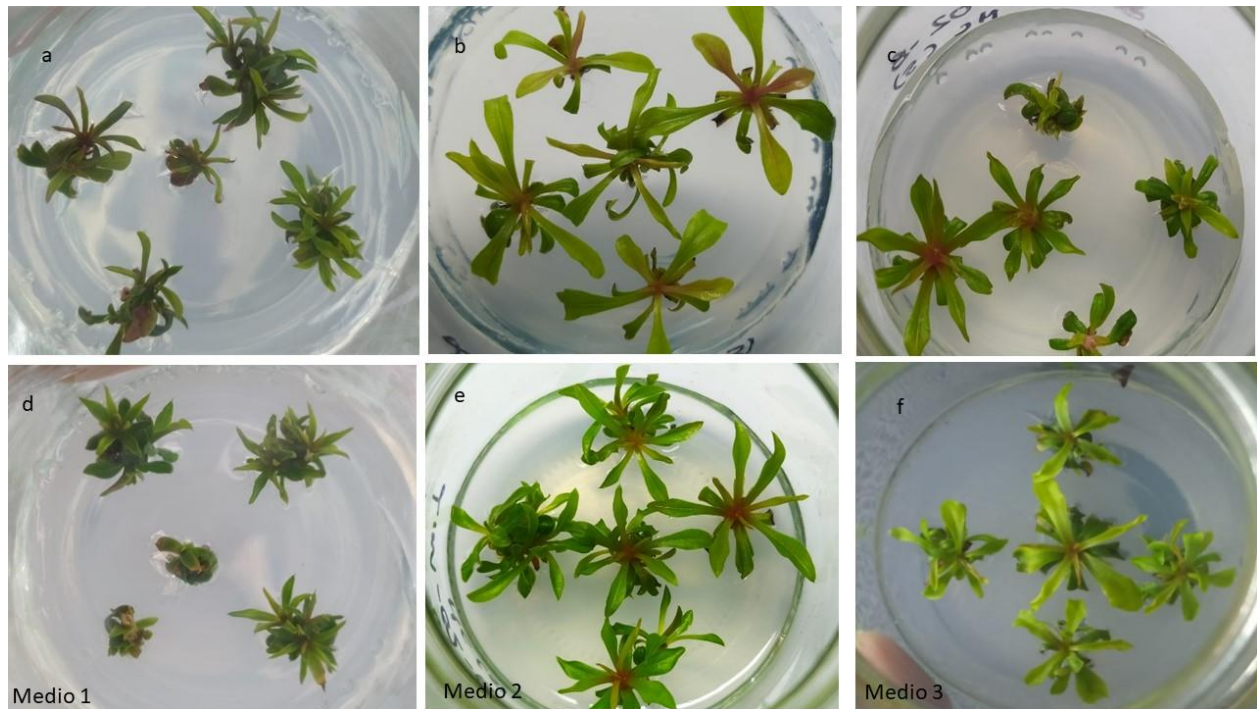


Figura 2. Desarrollo de vitroplantas de *Limonium altaica x Limonium latifolia* variedad Supreme White durante la fase de multiplicación con **a, b y c.** luz natural + artificial y solamente **d, e y f.** luz natural en cada uno de los medios de cultivo ensayados.

5.3 Fase III: Enraizamiento

Una vez finalizados los dos subcultivos durante la fase de multiplicación fue posible realizar el proceso de selección de aquellas vitroplantas que cumplieron con los requisitos para el proceso de enraizamiento (figura 3a-c). Durante esta fase, fue posible observar el desarrollo de raíces más compactas, cortas y con mayor vigor o fuerza en el medio M1 en comparación con las raíces formadas en las plantas sembradas en el medio M2, las cuales eran más delgadas, alargadas y débiles (figura 3f-g).

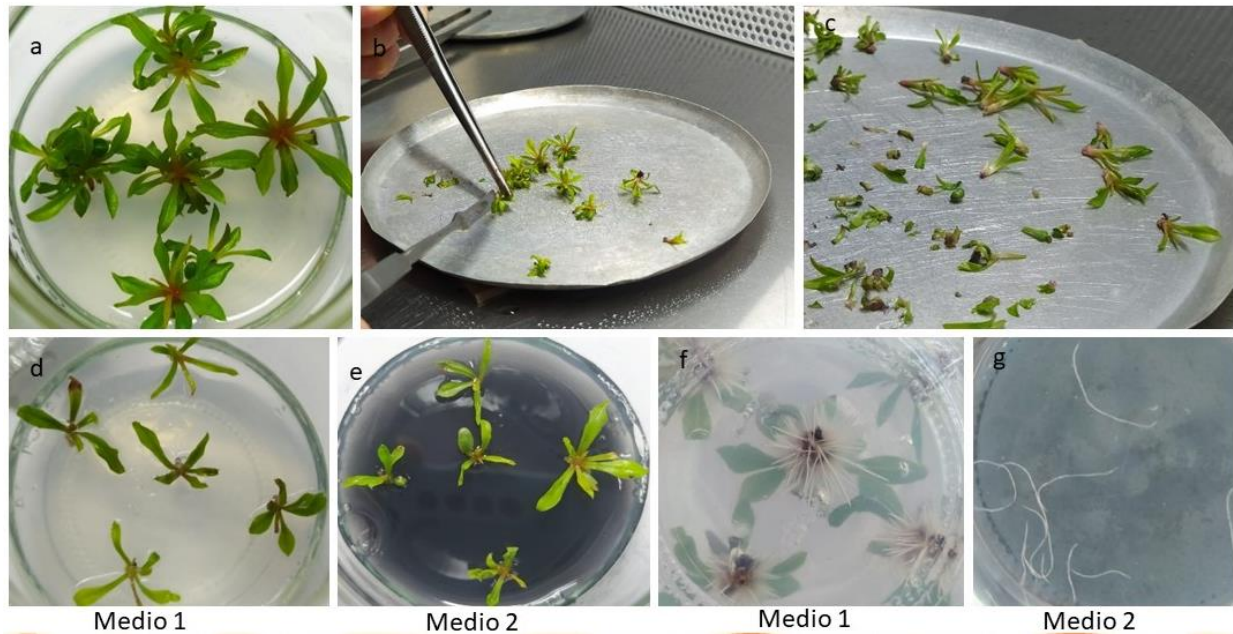


Figura 3. Fase de enraizamiento de vitroplantas de *L. altaica x Limonium latifolia* variedad Supreme White. **a, b y c.** Proceso de selección de las vitroplantas para enraizamiento. **d y e.** Siembra en los medios de cultivo de enraizamiento M1 y M2. **f y g.** Desarrollo radicular tras 4 semanas en la fase de enraizamiento en los medios M1 y M2.

En el proceso de enraizamiento se obtuvo un resultado satisfactorio en ambos medios de cultivo evaluados. Como se observa en la figura 4, el 100 % de las vitroplantas sembradas en ambos medios enraizaron.

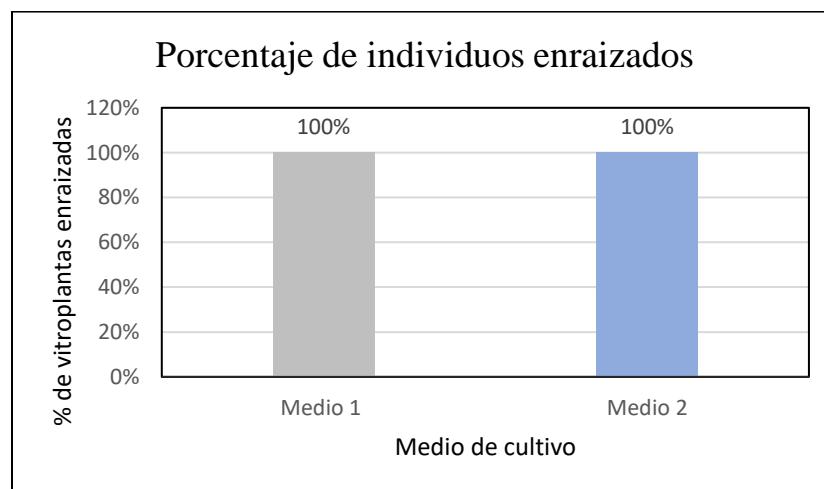


Figura 4. Porcentaje de vitroplantas de *L. altaica x Limonium latifolia* variedad Supreme White enraizadas durante la fase de enraizamiento en los medios de cultivo M1 y M2.

Aunque las plantas enraizaron en ambos medios, se observaron algunas diferencias morfológicas durante el seguimiento al proceso *in vitro*. Aquellas plantas que crecieron en el medio M1, desarrollaron raíces más compactas y cortas, eran plantas más vigorosas y con un mayor número de hojas en comparación con aquellas plantas que se desarrollaron en el medio M2, las cuales presentaron hojas más débiles y en menor cantidad además de raíces más alargadas y débiles (Figura 5).

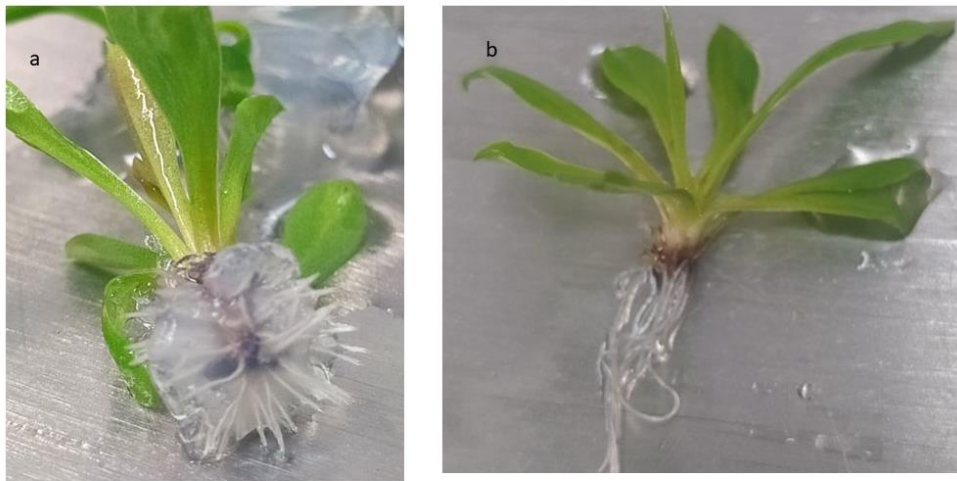


Figura 5. Vitroplantas de *L. altaica x Limonium latifolia* variedad Supreme White enraizadas en los medios de enraizamiento **a.** M1 y **b.** M2.

5.4 Fase IV: Aclimatación/endurecimiento

Durante el lavado de las raíces de las vitroplantas para proceder con la fase de aclimatación, fue identificado que las raíces de las plantas que enraizaron en el medio M1 eran más fuertes para soportar el respectivo lavado. Las raíces de las plantas que se desarrollaron en el medio M2 eran muy débiles y algunas veces se partían durante el lavado. Sin embargo, la sobrevivencia de ambos tipos de plantas fue satisfactorio, ya que lograron adaptarse en ambos sustratos ensayados (figura6).

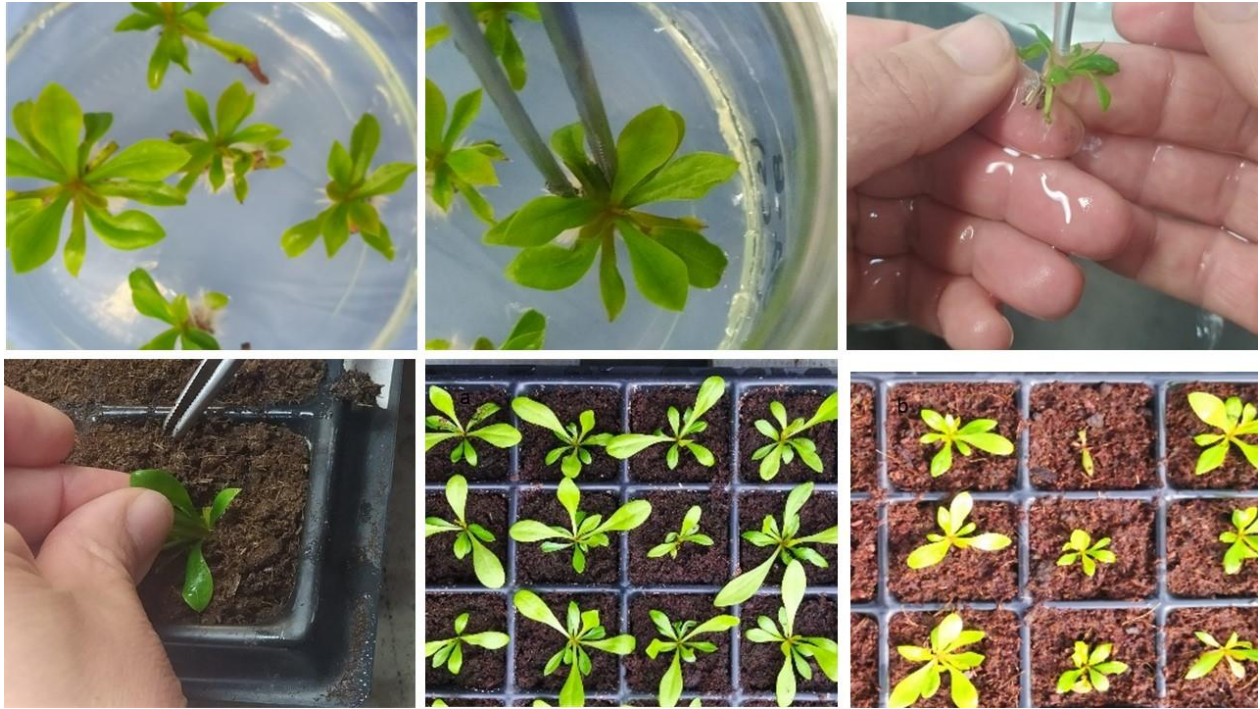


Figura 6. Proceso de aclimatación/endurecimiento de vitroplantas de *L. altaica x Limonium latifolia* variedad Supreme White. **a.** lavado de raíces, siembra en sustratos de **a.** turba y **b.** coco.

El desarrollo de las plantas en esta etapa presentó un alto porcentaje de supervivencia. Solamente una planta proveniente del medio 2 de enraizamiento no sobrevivió. Siendo que, el porcentaje de supervivencia de las plantas enraizadas en el medio 2 en el sustrato de coco fue del 96 % (Figura 7).

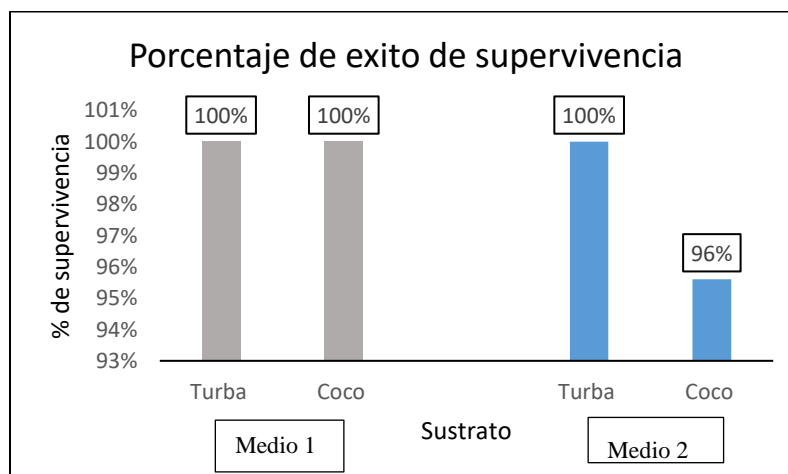


Figura 7. Porcentaje de supervivencia de vitroplantas de *L. altaica x Limonium latifolia* variedad Supreme White a la fase de aclimatación según el medio de enraizamiento M1 y M2.

Durante esta fase, el comportamiento de plantas provenientes del medio de cultivo M1 de enraizamiento, presentaron un desarrollo foliar superior con respecto a las provenientes del medio M2. Plantas provenientes del medio M1 y que endurecieron en turba presentaron hojas más largas que las plantas endurecidas en coco. Adicionalmente, estas plantas tuvieron hojas más grandes que aquellas plantas provenientes del medio de enraizamiento M2 y que fueron endurecidas en cualquiera de los dos sustratos (figura 8).

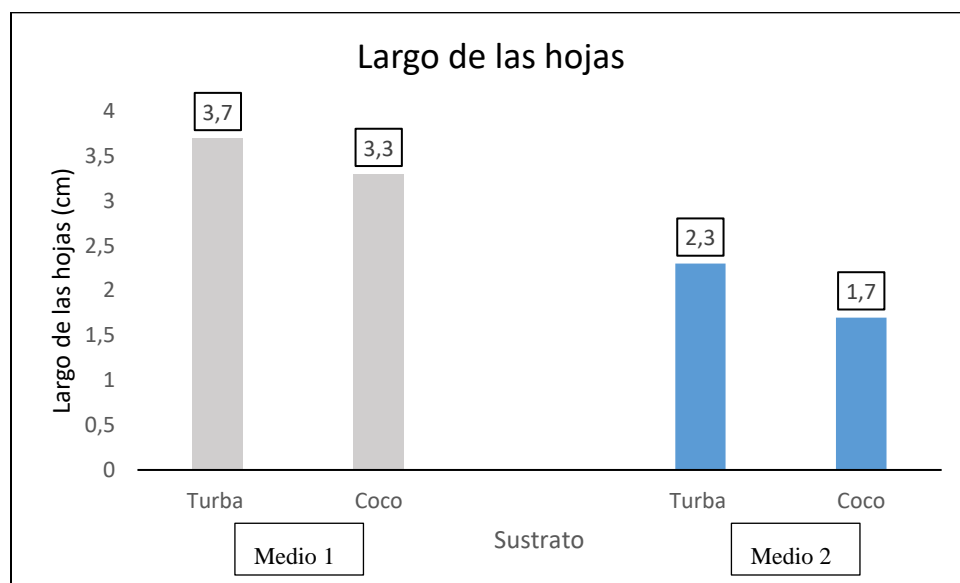


Figura 8. Largo de las hojas de plantas de *L. altaica x Limonium latifolia* variedad Supreme White en cada tipo de sustrato durante la fase de aclimatación/endurecimiento.

Durante el seguimiento a la fase de endurecimiento, también fue posible determinar que las plantas provenientes del medio M2 presentaron un desarrollo más tardío y presentaron un número menor de hojas (Figura 9). Con estos experimentos, fue posible concluir que el mejor medio de cultivo de enraizamiento fue el medio M1 y que el mejor sustrato para la aclimatación y el endurecimiento fue la turba.

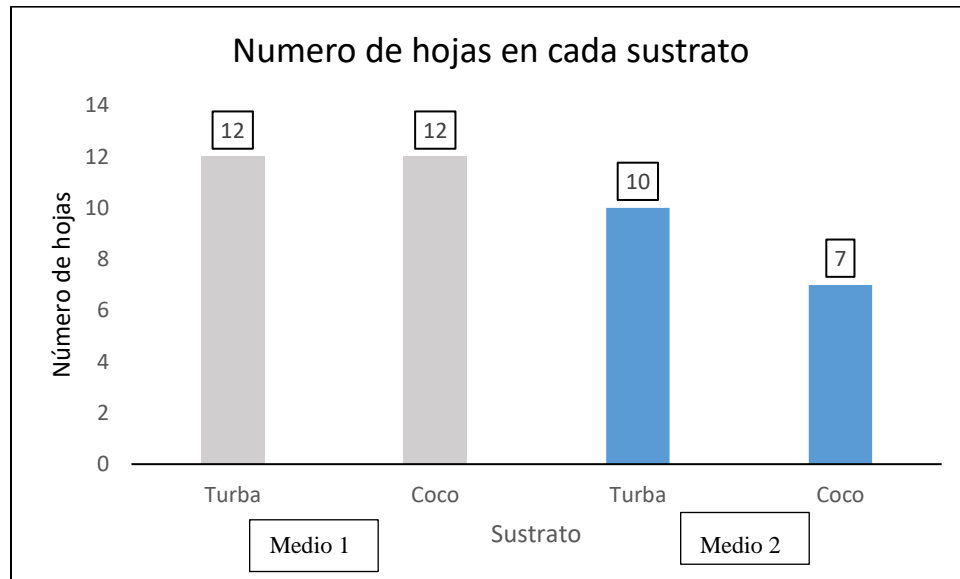


Figura 9. Número de hojas desarrolladas en plantas de *L. altaica x Limonium latifolia* variedad Supreme White durante la fase de aclimatación/endurecimiento en cada sustrato.

6. ANÁLISIS

6.1 Fase II: Multiplicación.

En esta fase de multiplicación, en la cual se evaluaron tres medios de cultivo, se logró determinar que existía una incidencia en el coeficiente de multiplicación por parte de la composición de los medios de cultivo, principalmente por las diferentes concentraciones en los reguladores de crecimiento. El medio óptimo para el desarrollo de las vitroplantas fue el medio con menor concentración de la hormona bencilaminopurina (BAP 0,05 mg.L⁻¹) y de la vitamina pantotenato de calcio (0,5 mg.L⁻¹). Como se mencionó en los resultados, las plantas mostraron un buen tamaño de hojas y una buena coloración verde. El desarrollo de las diferentes vías de cultivo se basa en la capacidad que tienen las células para regenerar una planta completa idéntica a la original. Con el empleo de reguladores de crecimiento como auxinas, citoquininas y giberelinas, se generan una serie de reacciones en las células vegetales que alteran los procesos metabólicos y posibilitan obtener resultados de interés en el área de la biotecnología vegetal [21]. La fitohormona Bencilaminopurina, es una citoquinina que tiene la capacidad de estimular e inducir una alta proliferación y división celular, permitiendo el desarrollo vegetal y jugar un rol importante en el aumento y generación de la producción de brotes a nivel vegetal [22]. Por lo tanto, al utilizar los reguladores de crecimiento en las concentraciones adecuadas, se presenta un mejor desarrollo de las vitroplantas permitiendo el crecimiento foliar apropiado para el proceso de micropropagación.

Albeiro *et al* [3], realizaron un estudio en donde evaluaron diferentes concentraciones de algunos reguladores de crecimiento en las fases de multiplicación y enraizamiento *in vitro* de Limonium var. Misty blue, logrando determinar que en la fase de multiplicación las plantas tuvieron un mejor desarrollo en el medio de cultivo MS suplementado con BAP a 0,5 mg.L⁻¹, similar a lo observado en esta investigación para la variedad Supreme White. En este trabajo se encontró que altas concentraciones de las citoquininas evaluadas redujeron la tasa de multiplicación, razón por la cual posiblemente en el medio 1 se presentó un menor coeficiente de multiplicación, debido a que presentaba una mayor concentración de BAP.

En otra investigación realizada por Sidnei *et al* [25], donde se realiza la propagación *in vitro* de Limonium Latifolium Kuntze (Plumbaginaceae), se verificó que altas concentraciones de BAP

estimulan la emisión de escasos y pequeños brotes vegetativos, con un crecimiento lento, impidiendo el uso en las siguientes fases del proceso de micropropagación.

El tiempo entre cada subcultivo (4 semanas), para las vitroplantas *Limonium altaica x Limonium latifolia* variedad Supreme White, fue considerado el óptimo, ya que transcurrido este tiempo se observa una buena inducción de brotes, y por tanto un buen coeficiente de multiplicación. Además, se ha demostrado que se pueden obtener mayores beneficios en el medio de cultivo, cuando este es enriquecido con vitaminas esenciales como el pantotenato de calcio, ya que juega un papel importante en el cultivo de los tejidos [20]. Las vitaminas son compuestos necesarios utilizados en las plantas. Se ha demostrado que la combinación de vitaminas con otros componentes de los medios, tienen efectos directos e indirectos sobre el crecimiento de los callos, crecimiento somático, enraizamiento y desarrollo embrionario [29].

Los complejos vitamínicos contienen elementos que son esenciales para las plantas, aunque estas son usualmente sintetizadas por las mismas plantas, las vitaminas son también requeridas para su crecimiento y diferenciación cumpliendo un rol importante catalítico en el metabolismo celular. Cuando las células de plantas superiores son cultivadas *in vitro*, la ausencia de vitaminas constituye un factor limitante del crecimiento. Las vitaminas adicionadas normalmente en medios de cultivo son la tiamina – HCL, biotina, ácido fólico, ácido pantoténico y riboflavina [30]. En el cultivo de tejidos algunas plantas pueden volverse deficientes en la síntesis de vitaminas, por lo tanto es esencial complementar los medios de cultivo para los tejidos vegetales con los niveles óptimos para obtener un crecimiento vigoroso [29].

Un estudio realizado por Jonny *et al* [31], se demostró que la propagación vegetativa de las papas en cultivos líquidos, a medida que se utilizaron diferentes concentraciones de ácido pantoténico, vitaminas y tiamina condujo a una respuesta positiva sobre la tasa de multiplicación del material vegetal.

Las hormonas en diferentes concentraciones determinan el crecimiento de los órganos en la planta e interactúan con otros factores como el genotipo, la temperatura y la luz [25]. Sin embargo, se demostró que la luz natural que recibe la cámara de crecimiento número 3 es suficiente para las vitroplantas de *Limonium altaica x Limonium latifolia* variedad Supreme White, por lo cual no es necesario el uso de luces artificiales adicionales, propiciando así a la economía del proceso.

De acuerdo con lo expuesto anteriormente el medio para la multiplicación de la especie *L. altaica* x *L. latifolia* variedad Supreme White en las condiciones actuales que se presentan en la Sede de Desarrollo, es el medio 3 cuya composición presenta lo niveles más bajos de los reguladores de crecimiento, aportando esto no solo a la economía del proceso, sino también al buen desarrollo de las vitroplantas, disminuyendo la posibilidad de cambios genéticos durante el proceso.

6.2 Fase III: Enraizamiento

En el enraizamiento la inducción de un sistema radicular saludable es una parte esencial en el desarrollo exitoso de las vitroplantas. La concentración y fuente de la hormona auxina tiene una incidencia significativa en el desarrollo de las raíces [30]. Como se observó en los estudios realizados en este proyecto, el enraizamiento de las vitroplantas, presentó un 100 % de efectividad en el desarrollo radicular (figura 4), ya que todas los explantes dispuestos en los dos medios enraizaron. Esto debido a la fuente de auxina utilizada (ácido indolbutírico), y a la concentración proporcionada de $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$. Como ha sido demostrado en varios estudios realizados [3], [4], la hormona que generalmente presenta un mejor efecto sobre el desarrollo radicular es el ácido indolbutírico (IBA). En ambos estudios se evaluaron varias concentraciones de IBA (0,5 , 1 y 3 mg.L^{-1}), determinándose que el número de raíces fue directamente proporcional a la concentración del regulador y la longitud de las raíces fue inversamente proporcional a la concentración utilizada. Por lo tanto, al asociar la longitud y el número de raíces, la concentración recomendada de esta hormona para la fase de enraizamiento oscila entre $0,5 - 1 \text{ mg.L}^{-1}$, garantizando entre 21 y 28 raíces por brote, con una longitud entre 6 – 12 mm, para *Limonium* var. Misty blue. Sidney *et al* también determinaron que una concentración de 1 mg.L^{-1} de IBA es apropiada para la fase de enraizamiento *in vitro* de *Limonium Latifolium*, ya que las plantas sometidas a esta auxina presentaron un mayor número de hojas, raíces largas y la supervivencia a la aclimatación fue satisfactoria, mostrando un 100% de supervivencia [25].

Dentro de las diferencias observadas durante el seguimiento de esta etapa de micropropagación, fue que los explantes sembrados en el medio 1, presentaban unas raíces más compactas, cortas y con mayor vigorosidad con respecto a las raíces presentes en el medio 2, esto

debido a la presencia de carbón activado en el medio 2. Posiblemente la presencia de este componente en el medio no permitió un engrosamiento en las raíces, presentando debilidad y un menor número en las misma. Así mismo se observa en un estudio realizado para el control de la oxidación de segmentos nodales en *Eucalyptus grandis* Hill Ex Maiden, la mayor cantidad de cultivos con raíces adventicias se observó en el tratamiento exento de carbón activado [23]. En algunas ocasiones, el carbón activado puede no ser benéfico cuando se utiliza en el cultivo *in vitro* de plantas, así como lo menciona Pascal. Este autor, relata que el carbón activado puede adsorber los componentes del medio de cultivo necesarios para el desarrollo de las vitroplantas, y podría además perjudicar la emisión de raíces de los mismos.

Otra de las variables importantes en el desarrollo de la vitroplantas son las condiciones ambientales propiciadas y monitoreadas durante el proceso de micropropagación, como lo son la temperatura y la humedad relativa. Estos factores inciden directamente en el progreso de los explantes en cada una de etapas. Durante el proceso llevado a cabo para *Limonium altaica x Limonium latifolia* variedad Supreme White, en las etapas de multiplicación y enraizamiento se mantuvo un rango de temperatura entre 18 - 22 °C, y entre 30 – 55 % de humedad relativa. El desarrollo y crecimiento de los explantes fue apropiado y productivo, como se observo en los resultados obtenidos para cada una de las etapas antes mencionadas. Sin embargo, en un estudio realizado para la propagación *in vitro* de la estaticia *Limouuim sinatum* CV. Midnigth blue [32], se utilizó una temperatura de 24 °C y una humedad relativa de 70 % durante el proceso de micropropagación.

6.3 Fase IV: Aclimatación/endurecimiento

Durante la fase de aclimatación a las condiciones *ex vitro* o en invernaderos, las plantas presentaron un alto porcentaje de supervivencia. Esto pudo deberse al uso de auxinas durante el enraizamiento y a la alta humedad relativa a la que estuvieron expuestas. En algunos estudios [3], [27], ya fue reportado que el uso de auxinas en la etapa de enraizamiento favorece una respuesta positiva de las plantas durante la aclimatación, potencializando el enraizamiento *ex vitro*. Además, se conoce la gran importancia a una alta humedad del aire en el periodo de aclimatación [25].

En el desarrollo de esta investigación se logró observar durante los 18 días de la aclimatación *ex vitro*, que la supervivencia de las vitroplantas tanto en sustrato de turba como en

coco, fue alta. Sin embargo, al analizar detalladamente el desarrollo de estas, aquellas plantas que desarrollaron sus raíces en el medio M1 de enraizamiento presentaron un mejor desarrollo en relación a la cantidad y largo de las hojas en ambos tipos de sustratos con respecto a las que enraizaron en el medio M2. Posiblemente esto se debió al tipo de raíz generada en la fase de enraizamiento, ya que como se mencionó anteriormente, las raíces formadas en el medio M2 fueron menos vigorosas, probablemente afectando la disponibilidad de los nutrientes para las plantas. Según Sánchez *et al*, es muy importante considerar el desarrollo de las raíces, ya que asegura que la vitroplanta puede absorber agua y nutrientes, y de esta manera convertirse en una planta totalmente autotrófica, es decir, con la capacidad de sintetizar las sustancias esenciales para su metabolismo [26].

En una evaluación realizada para la fase de aclimatación de vitroplantas de Queñoa, con diferentes sustratos entre los cuales estuvo la turba, mezclada en diferentes proporciones con estiércol vacuno y tierra, se obtuvo un porcentaje de supervivencia superior al 78 %, logrando superar el cambio de las condiciones *in vitro* a las condiciones ambientales naturales de invernadero. Según estos autores, estos resultados estarían relacionados con varios factores como el uso de plántulas provenientes del mejor medio de enraizamiento [27]. Así mismo, de acuerdo con Claret Antonio Vasco [28], en un estudio realizado para la aclimatación de plántulas de Orquídea *Epidendrum ibaguense*, en la mezcla de fibra coco y turba (1:1) se presentó un porcentaje de sobrevivencia del 84%, favoreciendo el desarrollo de las plántulas.

7. CONCLUSIONES

Ambos medios de cultivo evaluados en la fase de multiplicación mostraron ser un óptimos para el desarrollo de las vitroplantas de *Limonium altaica x Limonium latifolia* variedad Supreme White, y así poder aumentar el coeficiente de multiplicación. Como entre el medio 2 y 3 no hubo diferencias significativas, el medio con menor concentración de reguladores de crecimiento se consideró el medio propicio para la empresa ya que reduce costos durante el proceso productivo y además reduciría el riesgo de variaciones somaclonales en las vitroplantas.

En la composición de los medios de cultivo, para la fase de multiplicación de plantas de *Limonium altaica x Limonium latifolia* variedad Supreme White, a concentraciones más bajas de citoquinina, presenta una mayor eficiencia en la proliferación de brotes como se observó en el medio M3. Al aumentar las concentraciones de esta hormona puede conducir a una desdiferenciación de los brotes y obtenerse un coeficiente de multiplicación menor como ocurrió en el medio M1.

No se encontraron diferencias significativas para el factor luz en las cámaras de crecimiento en la Sede de Desarrollo Tecnológico e Innovación, indicando que el efecto sobre el coeficiente de multiplicación se debe principalmente al medio, y no a las condiciones de luz evaluadas. Por lo tanto, no es necesario utilizar luces artificiales adicionales para la fase de multiplicación. Esto reducirá aún más los costos durante el proceso productivo.

Las condiciones que se mantuvieron monitoreadas durante el proceso de micropropagación específicamente las de temperatura y humedad relativa, demostraron ser optimas en el desarrollo del proceso, permitiendo el crecimiento y progreso en cada una de las etapas.

Con el seguimiento al desarrollo de las vitroplantas o su respuesta a cada uno de los medios durante la variable tiempo, fue posible concluir que las 4 semanas estandarizadas tanto para la fase de multiplicación (subcultivos), como para la fase de enraizamiento, son el tiempo necesario para el correcto desarrollo de las vitroplantas sin observarse síntomas de estrés en las mismas.

Las vitroplantas que enraizaron en el medio de cultivo sin carbón activado presentaron un mejor desarrollo radicular y un mejor comportamiento en la etapa de endurecimiento, confirmando que ese medio de enraizamiento permite la posterior adaptación de las vitroplantas de *Limonium altaica x Limonium latifolia* variedad Supreme White a las condiciones *ex vitro*.

Aunque el mejor desarrollo durante la aclimatación fue observado en turba, es posible utilizar el sustrato de coco para el proceso de aclimatación, ya que las plantas consiguen desarrollarse correctamente en él y es más económico.

8. RECOMENDACIONES

En la etapa de multiplicación se recomienda que los frascos en donde se realice la siembra de las vitroplantas contengan un menor número de explantes para tener una mejor distribución de los nutrientes y así lograr un mejor desarrollo de la planta y posiblemente un mayor coeficiente de multiplicación.

Como no fueron encontradas diferencias significativas entre el medio de cultivo 2 y 3 de multiplicación, se recomienda a la empresa utilizar el medio de cultivo más económico y con menor concentración de hormonas de crecimiento, con el fin de disminuir el costo en la producción y evitar posibles alteraciones en las vitroplantas.

Debido a que el sustrato de turba es tan costoso para la etapa de aclimatación, se sugiere realizar estudios en los cuales se realice una mezcla del sustrato turba - coco, y observar el comportamiento de las plantas determinando la mejor opción para el proceso, con fin de disminuir los costos en el proceso de micropropagación.

Se sugiere realizar una investigación posterior con la empresa interesada en las plantas, con el fin de verificar el comportamiento de las plantas en campo y asegurar el fenotipo final de las plantas producidas por cultivo de tejidos vegetales.

9. REFERENCIAS

- [1] Estadísticas, «ASOCOLFLORES,» 2004. [En línea]. Available: www.asocolflores.org/info/info.php. [Último acceso: Julio 2022].
- [2] M. L. Quíros, «La floricultura en Colombia en el marco de la globalización; aproximaciones hacia un análisis micro y macroeconómico,» *REVISTA Universidad EAFIT*, n° 122, 2001.
- [3] A. H. Chamorro, J. C. Fernández, S. L. Martínez y T. Mosquera , «Evaluación de diferentes concentraciones de algunos reguladores de crecimiento en la multiplicación y enraizamiento in vitro de *Limonium* var. *Misty blue*,» *Agronomia Colombiana*, 2007.
- [4] S. Khadka, N. Rana y S. Rajbahak, «In-vitro Mass Propagation of *Limonium sinuatum* L. Mill. (statice),» *Department of Plant Resources, Taphathali, Kathmandu, Nepal*, vol. 17, n° 1, p. 8, 2019.
- [5] J. Sánchez, «Estudio y optimización del proceso de propagación in vitro de *Limonium Sinuatum* Técnicas avanzadas en investigación,» *M.S.Tesis, Universidad Politécnica de Cartagena, Cartagena 2018*.
- [6] M. Remedios, «Propagación in vitro y estudio con marcadores moleculares y cromosómicos de *Limonium perplexum* L. Sáez & Rosselló,» *M.S. Tesis, Universitat València, València, 2012*.
- [7] Y. d. C. Oviedo y E. Guevara , «Propagación in vitro de la Estática *Limonium Sinatum* CV. *Midnight blue*,» *Agronomía Costarricense*, vol. 12, n° 1, pp. 113-122, 1988.
- [8] S. PHOMER, «Bouquets Colombianos conquistan a Estados Unidos,» *Información preferencial flores* , pp. 6-7, septiembre 14 2004 .
- [9] A.-. Marco y I. J.B, «Micropropagation of *Limonium cavanillesii* Erben, a threatened statice, from inflorescence stems,» *Plant grow regulation* , vol. 24, n° 1, pp. 49-54, 1998.
- [10] R. Renneberg, *Biología para principiantes*, Reverté, 2020.
- [11] J. P. Duque, *Biología*, Netbiblo, 2010.
- [12] A. Ortuño, I. Díaz, I. Pérez , F. Sánchez y J. A. Del río, «Biological active compounds from *Limonium insigne* and alternative methods,» *Scientia Horticulturae*, vol. 230, pp. 78-85, 2018.

-
- [13] L. Kyte, J. Kley, H. Scogins y M. Bridgen, *Plants from test tubes: an introduction to micropropagation*, Hachette UK, 2013.
- [14] E. Salazar y E. Soto , «Desarrollo de un protocolo de micropropagación de *Limonium sinuatum* variedad white pichincha,» *Tesis* , 2020.
- [15] F. Morgan y K. ED, *Limonium*. En *ornamental Crops*, Springer , 2018.
- [16] M. I. Segeren, «Biofábrica de plantas Ornamentales,» *Ornamental Horticulture*, vol. 13, 2007.
- [17] Kennedy H (1978) Systematics and pollination of the ‘closed-flowered’ species of *Calathea* (Marantaceae). *Univ Calif Publ Bot* 71:1–90
- [18] Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiological Plantarum* 15: 473-497.
- [19] Statgraphics Centurion, X. V. I. Statpoint Technologies. INC. version, 16, 17. 2009.
- [20] D. Andrade Diaz, M. E. Córdoba Figueroa, H. Criollo Escobar y T. C. Lagos Burbano, «Evaluación de medios de cultivo para propagación in vitro de semillas y explantes de especies silvestres de *Solanum*,» *Red de revistas científicas de América Latina, El Caribe, España y Portugal*, vol. 62, nº 1, p. 11, 2013.
- [21] M. Perea, *Cultivo de tejidos vegetales in vitro*, Bogotá: Proceditor Ltda, 2009.
- [22] J. S. Alcantara Cortes, J. Acero Godoy y J. D. Alcántara Cortés , «Principales reguladores hormonales y sus interacciones en el crecimiento vegetal,» *NOVA*, vol. 17, p. 21, 2019.
- [23] Zichner Zorz, M. I. Díaz Lezcano , L. R. Gonzáles Segnana y M. Vera de Ortiz, «Efecto del Carbón activado en el control de la oxidación de segmentos nodales de *Eucalyptus Grandis Hill ex Maiden* cultivados in vitro,» *Investigar Agrar*, vol. 14, nº 2, p. 9, 2012.
- [24] Souza, AV y Pereira, AMS. 2007. Enraizamiento de plantas cultivadas in vitro. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai. Botucatu. SP. BR.* v. 9, n. 4, p. 103-117 Disponible en: http://www.sbpmed.org.br/download/issn_07_4/artigo17_v9_n4.pdf
- [25] C. Sidnei Fior, L. R. Rodrigues y A. N. Kampf, «In vitro propagation of *Limonium Latifolium* Kuntzc (Plumbaginaceae),» *Cienc. Rural*, vol. 30, nº 4, 2000.

-
- [26] A. Sánchez , Z. C. Lara, A. Gutiérrez , G. Vargas , M. L. Coronado y M. Esqueda , «Aclimatación y trasplante de vitroplantas de *Agave angustifolia* Haw. en condiciones silvestres,» *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, vol. 11, n° 7, p. 8, 2020.
- [27] C. Mollohuacan, E. Bustamante , L. Mayta y R. Bardalex , «Enraizamiento *in vitro* y la influencia de cuatro tipos de sustrato en la aclimatación de Queñoa *Polylepis rugulosa* Bitter,» *Revista de investigación científica Manglar* , vol. 19, n° 1, p. 8, 2022.
- [28] C. A. V. Avila, «Evaluación del enraizamiento *in vitro* y aclimatación de plántulas de Orquidea *Epidendrum ibaguense*,» Cajicá Cundinamarca , 2020.
- [29] P. Abrahamian y A. Kantharajah, «Effect of Vitamins on *In vitro* Organogenesis of plant,» *American Journal of Plant Science* , p. 6, 2011.
- [30] S. Sharry , M. Adema y W. Abedini , Plantas de probeta Manula para la propagación de plantas por cultivo de tejidos *in vitro*, Editorial de la Universidad de la planta .
- [31] J. E. Scherwinski pereira y G. Renan de luces Fortes , «protocolo para la producción de material propagativo de batata en medio líquido,» *Pesquisa agropecuária Brasileira* , vol. 38, n° 9, p. 9, 2018.
- [32] Y. Oviedo y E. Guevara , «Propagación *in vitro* de la estacía *Limonium sinatum* CV. midnight blue,» *Agronomía costarricense* , vol. 12, n° 1, p. 10.